

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Caracterização molecular e pesquisa de agentes patogénicos  
em carraças de Angola, Cabo Verde, Guiné-Bissau,  
Moçambique e Portugal**

Wilson Emanuel Rodrigues Marques

**Mestrado em Biologia Humana e Ambiente**

Dissertação orientada por:  
Professora Doutora Deodália Dias, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa,  
Doutora Fernanda Rosa, Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

2017

A escrita desta dissertação não segue as regras do novo acordo ortográfico.

As referências bibliográficas seguem as normas da revista *Ticks and Tick-borne Diseases*.

## **Agradecimentos**

Queria deixar uma dedicatória especial à minha avó Catarina Crispim que infelizmente faleceu este ano. Uma verdadeira fonte de inspiração e motivação que me empurrou para a frente toda a vida e que infelizmente não pode estar aqui comigo no fim desta longa jornada académica para a qual tanto contribuiu para o seu sucesso. É verdadeiramente difícil expressar por palavras toda a gratidão que lhe sinto.

Queria, ainda, deixar o agradecimento às minhas orientadoras, à Professora Doutora Deodália Dias e à Doutora Fernanda Rosa que tanto contribuíram para o sucesso desta Dissertação, por estarem sempre disponíveis para me ajudar, por tudo o que me ensinaram ao longo deste ano e pela positividade que me transmitiram desde o início.

## Resumo

As carraças são artrópodes hematófagos com relevância médica e veterinária que parasitam vertebrados. Apresentam uma distribuição global e habitam em quase todas as regiões terrestres que permitam contacto com hospedeiros vertebrados. As carraças e doenças transmitidas pelas mesmas podem afectar humanos, animais de companhia, gado e animais silvestres e são responsáveis por perdas económicas significativas e pela transmissão de diversos agentes patogénicos que podem causar várias doenças.

Dada a sua importância zoonótica é importante fazer uma correcta identificação das carraças para conseguir um controlo o mais eficaz possível das doenças transmitidas pelas mesmas. Tradicionalmente esta identificação é baseada em características morfológicas, no entanto algumas espécies têm uma variabilidade inter e intra-específica dos seus caracteres morfológicos o que dificulta a sua identificação. Face a este problema é necessário um método adicional para a identificação das carraças recorrendo a métodos moleculares. O *DNA Barcoding* é um método que usa pequenos marcadores genéticos como o COI, 16S rDNA e 12S rDNA que têm uma variabilidade intra-específica baixa, mas uma variabilidade inter-específica suficientemente grande para permitir a distinção das diferentes espécies.

Este tipo de estudos contribui para o conhecimento dos vários agentes patogénicos associados às diferentes espécies de carraças e facilita uma rápida e eficaz identificação das carraças e dos seus agentes patogénicos usando meios moleculares que não necessitam de um taxonomista experiente. Estes factores ajudam na obtenção de um diagnóstico correcto no contexto de uma situação médica ou veterinária.

Foram usados primers com especificidade para *Babesia* spp. e *Hepatozoon* spp., e para a família *Anaplasmataceae* em DNA extraído de carraças para pesquisar agentes patogénicos. Cinco carraças do género *Rhipicephalus* e duas carraças do género *Dermacentor* apresentaram resultados positivos quando testados com os primers específicos da família *Anaplasmataceae*. Duas carraças do género *Rhipicephalus*, uma do género *Dermacentor* e mais uma do género *Ixodes* apresentaram resultados positivos quando testadas com os primers específicos dos géneros *Babesia* e *Hepatozoon*. Estes resultados estão de acordo com a Bibliografia.

Os resultados mostraram também uma dificuldade na obtenção de amplicões do marcador COI o que pode ser o resultado de uma falta de especificidade dos primers em relação ao género *Rhipicephalus*, isto é algo esperado uma vez que os primers usados foram originalmente criados em experiências que não visavam este género.

Foi, ainda, possível estabelecer as relações filogenéticas entre as diversas espécies do género *Rhipicephalus*, no entanto ainda há alguns problemas de nomenclatura que precisam de ser esclarecidos, nomeadamente no caso das diversas espécies pertencentes ao complexo *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*.

**Palavras-chave:** Carraças, Identificação, Caracterização molecular, Agentes Patogénicos, Filogenia

## Abstract

Ticks are medically important hematophagous arthropods that parasitize vertebrates. They have a global distribution and live in almost all terrestrial regions what allows close contact to several vertebrate hosts. Ticks and tick-borne diseases affect humans, companion animals, cattle and wildlife and they are responsible for significant economic losses and for the transmission of several pathogens that can cause disease.

Given their zoonotic importance it is very important to correctly identify the involved ticks to achieve a more efficient tick-borne disease control. Traditionally this identification is based on morphological features, however some species have a significant inter and intra-specific phenotypical variability which difficulties the identification, hence the need for an additional identification method using molecular techniques. DNA barcoding is a method which uses small genetic markers like COI, 16S rDNA and 12S rDNA which have a small intra-specific variability but a sufficient level of inter-specific variability to distinguish different species.

These kinds of studies contribute to the knowledge of the diverse pathogens associated with the different tick species which results in a fast and effective way to identify both ticks and their pathogens using molecular methods which don't require a trained taxonomist. These factors help providing a correct diagnosis in the context of a medical or veterinary situation.

Primers with specificity to *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp. and the *Anaplasmataceae* family were used in the DNA extracted from ticks to search for pathogens. Five ticks from the genus *Rhipicephalus* and two ticks from the genus *Dermacentor* have shown positive results when tested with *Anaplasmataceae* family specific primers whilst two ticks from the genus *Rhipicephalus*, one from the genus *Dermacentor* and one from the genus *Ixodes* have shown positive results to the *Babesia* and *Hepatozoon* genera specific primers. These results are in accordance with the results obtained by other authors.

Results have shown some difficulty in obtaining COI amplicons which may be the result of a lack of primer specificity with the genus *Rhipicephalus*, this is somewhat expected as the primers used were originally designed in experiments which didn't focus on this genus.

It was possible to establish a phylogenetic relation between the several species of *Rhipicephalus* genus however some issues have yet to be solved such as the nomenclature of the several species of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* complex.

**Keywords:** Tick, Identification, Molecular characterization, Pathogens, Phylogeny

# Índice

Agradecimentos .....	iii
Resumo .....	iv
Abstract .....	v
Índice .....	vi
Lista de figuras.....	viii
Lista de tabelas.....	x
Lista de abreviaturas .....	xi
1 Introdução .....	1
1.1 Ciclos de vida .....	1
1.1.1 Ciclo de vida com três hospedeiros.....	1
1.1.2 Ciclo de vida com um e dois hospedeiros .....	1
1.2 Importância em saúde pública .....	2
2 Objectivos.....	4
3 Material e Métodos.....	5
3.1 Amostragem .....	5
3.2 Extracção e avaliação da concentração de DNA de carraças .....	7
3.3 Primers utilizados para caracterização molecular das carraças.....	7
3.4 Amostras de carraças e marcadores moleculares utilizados .....	7
3.5 DNA de carraças usado para pesquisa de agentes patogénicos .....	8
3.6 Pesquisa de agentes patogénicos.....	8
3.6.1 Primers para pesquisa de agentes patogénicos .....	8
3.7 Amplificação por PCR e Sequenciação .....	10
3.7.1 DNA de carraças .....	10
3.7.2 DNA de agentes patogénicos .....	10
3.8 Análise bioinformática e filogenética .....	10
3.8.1 Análise filogenética da família <i>Anaplasmataceae</i> .....	10
3.8.2 Análise filogenética da família <i>Sphingomonadaceae</i> .....	10
3.8.3 Análise filogenética do género <i>Sphingomonas</i> para determinação da espécie a que pertence a amostra SFAB17 M.....	10
3.8.4 Análise filogenética do marcador COI .....	11
3.8.5 Análise filogenética do marcador 16S.....	11
3.8.6 Análise filogenética do marcador 12S.....	11
4 Resultados .....	13

4.1	Pesquisa de agentes patogénicos com os primers EC16S e PP18S .....	13
4.2	Identificação da sequência obtida de agentes patogénicos .....	14
4.3	Eficácia de amplificação dos marcadores usados para caracterização molecular: .....	18
4.4	Filogenia do género <i>Rhipicephalus</i> .....	19
5	Discussão .....	27
5.1	Pesquisa de agentes patogénicos .....	27
5.2	Identificação da sequência obtida de agentes patogénicos .....	27
5.3	Eficácia de amplificação dos marcadores usados para caracterização molecular: .....	29
5.4	Filogenia do género <i>Rhipicephalus</i> .....	31
6	Conclusões .....	36
7	Bibliografia .....	37
8	Anexos .....	41
8.1	Protocolo 1 – Extração de DNA (E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit) .....	41
8.2	Protocolo 2 – Amplificação por PCR do marcador COI: .....	42
8.2.1	Primers LCO1490_F / HCO2198_R .....	42
8.2.2	Primers Cox1F / Cox1R .....	42
8.3	Protocolo 3 – Amplificação por PCR do marcador 16S .....	42
8.4	Protocolo 4 – Amplificação por PCR do marcador 12S .....	42
8.5	Protocolo 5 – Electroforese em gel de agarose .....	42
8.6	Protocolo 6 – Purificação de DNA (SureClean Plus Kit) .....	42
8.7	Protocolo 7 – Amplificação por PCR dos marcadores EC16S/PP18S (agentes patogénicos) .....	43
8.8	Concentração e pureza do DNA das amostras .....	44

## Lista de figuras

Figura 4.1: a) Percentagem de amostras que apresentaram resultados positivos para a pesquisa de agentes patogênicos com os primers EC16S_F / EC16S_R. b) Percentagem de amostras que apresentaram resultados positivos para a pesquisa de agentes patogênicos com os primers PP18S_F / PP18S_R.....	13
Figura 4.2: Resultados do Blastn da sequência obtida organizados de acordo com a sua taxonomia...	14
Figura 4.3: Filogenia da família Anaplasmataceae obtida através do marcador 16S (Primers EC16S_F / EC16S_R). Árvore filogenética inferida pelo método Maximum Likelihood baseado no modelo Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993). Os números representam a percentagem de árvores em que os taxa associados ficaram juntos depois de 1000 simulações (valores abaixo de 75% foram omitidos). As amostras com um círculo fechado foram obtidas neste trabalho.....	15
Figura 4.4: Filogenia da família Sphingomonadaceae obtida através do marcador 16S (Primers EC16S_F / EC16S_R). Árvore filogenética inferida pelo método Maximum Likelihood baseado no modelo Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993). Os números representam a percentagem de árvores em que os taxa associados ficaram juntos depois de 1000 simulações (valores abaixo de 75% foram omitidos). As amostras com um círculo fechado foram obtidas neste trabalho. ....	15
Figura 4.5: Filogenia do género Sphingomonas obtida através do marcador 16S (Primers EC16S_F / EC16S_R) e usando apenas sequências obtidas num Blastn para este género com uma identidade superior a 95% com a amostra SFAB17M. Árvore filogenética inferida pelo método Maximum Likelihood baseado no modelo Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993). Os números representam a percentagem de árvores em que os taxa associados ficaram juntos depois de 1000 simulações (valores abaixo de 75% foram omitidos). As amostras com um círculo fechado foram obtidas neste trabalho. ....	16
Figura 4.6: Resultados do Blastn da sequência do primer EC16S_F organizados de acordo com a sua taxonomia.....	17
Figura 4.7: Resultados do Blastn da sequência do primer EC16S_R organizados de acordo com a sua taxonomia.....	18
Figura 4.8: a) Eficácia da amplificação das amostras com o marcador COI. b) Eficácia da amplificação das amostras com o marcador 16S. c) Eficácia da amplificação das amostras com o marcador 12S. ...	19
Figura 4.9: Filogenia do género Rhipicephalus obtida através do marcador COI. Árvore filogenética inferida pelo método Maximum Likelihood baseado no modelo Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993). Os números representam a percentagem de árvores em que os taxa associados ficaram juntos depois de 1000 simulações (valores abaixo de 75% foram omitidos).....	20
Figura 4.10: Distribuição geográfica das amostras pertencentes aos quatro clados de R. sanguineus obtidos através da análise filogenética do marcador COI. ....	21
Figura 4.11: Filogenia do género Rhipicephalus obtida através do marcador 16S. Árvore filogenética inferida pelo método Maximum Likelihood baseado no modelo Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993). Os números representam a percentagem de árvores em que os taxa associados ficaram juntos depois de 1000 simulações (valores abaixo de 75% foram omitidos). As amostras marcadas com um círculo fechado foram obtidas neste trabalho. ....	22
Figura 4.12: Distribuição geográfica das amostras pertencentes aos três clados de R. sanguineus obtidos através da análise filogenético do marcador 16S.....	23
Figura 4.13: Filogenia do género Rhipicephalus obtida através do marcador 12S. Árvore filogenética inferida pelo método Maximum Likelihood baseado no modelo Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993). Os números representam a percentagem de árvores em que os taxa associados ficaram juntos depois de 1000 simulações (valores abaixo de 75% foram omitidos). As amostras marcadas com um círculo fechado foram obtidas neste trabalho.....	24
Figura 4.14: Distribuição geográfica das amostras pertencentes aos três clados de R. sanguineus obtidos através da análise filogenético do marcador 12S.....	25



Figura 4.15: Distribuição geográfica das amostras pertencentes aos três clados de <i>R. turanicus</i> obtidos através da análise filogenético do marcador 12S. ....	26
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## Lista de tabelas

Tabela 1.1: Principais agentes patogénicos transmitidos ao homem por carraças. (Silva et al., 2006)...	3
Tabela 3.1: Amostras biológicas (carraças) utilizadas neste trabalho onde <b>ID</b> corresponde ao registo de cada uma das amostras na Colecção de Parasitologia do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa. ....	6
Tabela 3.2: Primers utilizados para caracterização molecular das carraças. ....	7
Tabela 3.3: Primers utilizados para pesquisa de agentes patogénicos. ....	8
Tabela 3.4: Amostras que foram usadas para pesquisa de agentes patogénicos com o par de primers EC16S (16S da família Anaplasmataceae) e com o par de primers PP18S (18S dos géneros Babesia e Hepatozoon). “V” significa que a amostra foi analisada para este marcador. Ausência de “V” significa que não foi analisada para este marcador. ....	9
Tabela 4.1: Resumo das amostras positivas / negativas para a detecção de Agentes Patogénicos .....	13
Tabela 4.2: Resumo da eficácia dos marcadores COI, 16S e 12S no total das amostras .....	18
Tabela 8.1 Amostras biológicas (carraças) utilizadas neste trabalho onde <b>ID</b> corresponde ao registo de cada uma das amostras na Colecção de Parasitologia do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa, A260 / A280 corresponde ao grau de pureza do DNA em relação a proteína, A260 / A230 corresponde ao grau de pureza do DNA em relação a fenóis e [DNA] corresponde à concentração de DNA em nG/μL. <sup>a</sup> significa que foi feita mais que uma medição e este valor é uma média das várias medições. ....	44

## Lista de abreviaturas

DNA – Ácido desoxirribonucleico

RNA – Ácido ribonucleico

COI – Sequência de DNA codificante correspondente à Subunidade I da Citocromo C Oxidase

16S – Sequência de DNA não codificante correspondente à subunidade 16S do RNA ribossomal.

12S – Sequência de DNA não codificante correspondente à subunidade 12S do RNA ribossomal.

*R.* – *Rhipicephalus* (Gênero *Rhipicephalus*)

*I. ventalloi* – *Ixodes ventalloi*

*D. marginatus* – *Dermacentor marginatus*

PCR – Reacção em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

*O.* – *Ornithodoros* (Gênero *Ornithodoros*)

*Blastn* - *Basic Local Alignment Search Tool* (para nucleótidos)

qPCR – *Quantitative PCR* ou *Real time PCR*

pb – Pares de bases

UVs – Raios ultravioletas

dsDNA – DNA em cadeia dupla (*Double stranded DNA*)

ssDNA – DNA em cadeia simples (*Single stranded DNA*)

ddH<sub>2</sub>O – Água bidestilada

E.U.A. – Estados Unidos da América

*S. leidy* – *Sphingomonas leidy*

*R. sanguineus s.l.* – *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*

*R. sanguineus s.s.* – *Rhipicephalus sanguineus sensu stricto*

# 1 Introdução

Os ixodídeos, vulgarmente conhecidos como carraças são artrópodes ectoparasitas hematófagos estritos não permanentes pertencentes à subclasse *Acari*. Estes ectoparasitas são altamente especializados e alimentam-se de vários animais como mamíferos, aves, répteis e anfíbios em todas as regiões da Terra, tendo portanto uma distribuição geográfica quase global. Apesar de uma ampla distribuição geográfica é reconhecida uma maior diversidade específica nas regiões tropicais e subtropicais (Anderson e Magnarelli, 2008; Silva et al., 2006).

Conhecem-se mais de 850 espécies de carraças que estão distribuídas por três famílias: *Nuttalliellidae*, *Argasidae* e *Ixodidae*. A família *Nuttalliellidae* é composta por apenas uma espécie *Nuttalliella namaqua* (Bedford, 1931) que possui características observadas nos elementos das duas outras famílias. Na família *Argasidae* são conhecidas cerca de 170 espécies que apresentam uma ausência do escudo dorsal e são, por isso, designadas de argasídeos ou “carraças de corpo mole”. A família *Ixodidae* consiste em cerca de 650 espécies que, devido à presença de escudo dorsal, são designadas por “carraças de corpo duro” (Magnarelli, 2009; Silva et al., 2006).

As carraças são aracnídeos e diferem bastante da maioria dos insectos que são vectores importantes de agentes patogénicos como mosquitos, flebótomos ou pulgas. Nestes vectores apenas os adultos e por vezes apenas as fêmeas fazem refeição de sangue, já as carraças são hematófagos estritos em todas as suas fases de desenvolvimento e portanto precisam de encontrar um hospedeiro (Schwan, 2011; Walker et al., 2003). A procura do hospedeiro pode dar-se de diversos modos. Algumas carraças sobem para a vegetação e esperam que um possível hospedeiro passe por lá, este comportamento é normalmente designando por “*questing*”. Outras carraças deslocam-se pelo chão atrás de possíveis hospedeiros. Estes comportamentos de procurar por hospedeiros em ambientes abertos são geralmente descritos como exofílicos. Há também carraças que optam por passar todo o seu ciclo de vida nas tocas ou ninhos dos seus hospedeiros, este comportamento é descrito como endofílico. E algumas espécies como por exemplo *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806), que geralmente parasita cães, adaptaram-se ao ambiente doméstico e portanto este comportamento é descrito como doméstico (Schwan, 2011; Walker et al., 2003).

## 1.1 Ciclos de vida

### 1.1.1 Ciclo de vida com três hospedeiros

Este é o ciclo de vida mais comum nas carraças. As larvas desenvolvem-se nos ovos até à eclosão num processo que costuma demorar várias semanas. Após eclosão as larvas fazem uma alimentação de sangue num primeiro hospedeiro, depois abandonam o hospedeiro e escondem-se no solo ou na vegetação. Sofrem a primeira muda atingindo o estado de ninfas. O ciclo de vida das ninfas é semelhante ao das larvas, mas após a muda emergem como carraças adulta fêmeas ou machos. As fêmeas alimentam-se uma vez e ovipositam uma grande quantidade de ovos, após a oviposição as fêmeas morrem. Os machos podem fazer várias refeições de sangue, acasalam e morrem. Após eclosão dos ovos ou das mudas as carraças ainda não têm um exo-esqueleto rígido e ficam inactivas durante uma a duas semanas até que o seu exo-esqueleto fique rígido. Este tipo de ciclo de vida é bastante lento e tem uma duração compreendida entre seis meses e vários anos. (Walker et al., 2003)

### 1.1.2 Ciclo de vida com um e dois hospedeiros

Estes são ciclos de vida menos comuns. Os ovos são postos no solo, as larvas eclodem após algumas semanas de desenvolvimento e começam a procurar um hospedeiro. Após encontrarem um hospedeiro e fazerem a refeição de sangue, as larvas continuam presas ao hospedeiro e sofrem a sua muda no hospedeiro. As ninfas alimentam-se no mesmo hospedeiro e à semelhança das larvas também sofrem a

sua muda no mesmo hospedeiro. Após a muda os adultos também se alimentam no mesmo hospedeiro e mudam de posição no mesmo hospedeiro para se reproduzirem. Assim o ciclo de vida com um hospedeiro dá-se na íntegra num único hospedeiro. Este tipo de ciclo de vida é, geralmente, muito rápido demorando cerca de três semanas. No caso do ciclo de vida com dois hospedeiros as larvas e as ninfas alimentam-se no mesmo hospedeiro mas o adulto procura um novo hospedeiro. (Walker et al., 2003)

## 1.2 Importância em saúde pública

As carraças são vectores de uma maior diversidade de agentes patogénicos do que qualquer outro grupo de artrópodes. Podem ser responsáveis por doenças que afectam humanos, animais de companhia, gado ou animais selvagens. As consequências destas doenças podem variar entre causar perdas monetárias significativas no caso do gado a patologias potencialmente fatais em humanos. (Jongejan e Uilenberg, 2004; Magnarelli, 2009)

As carraças são vectores de agentes patogénicos bastante eficientes, todas as suas fases de desenvolvimento precisam de se alimentar com o sangue dos hospedeiros e podem ter um ciclo de vida de um, dois ou três hospedeiros o que lhes permite não só transmitir agentes patogénicos a vários hospedeiros como também podem ser infectados pelos agentes patogénicos presentes num hospedeiro e transmitir, posteriormente, esses mesmos agentes patogénicos a outros hospedeiros. Algumas espécies de carraças podem apresentar também uma transmissão trans-ovarial e trans-estadial de agentes patogénicos o que potencia não só a sua eficiência como vectores de agentes patogénicos, mas também a sua capacidade de funcionar como reservatório de doença. (Dantas-Torres, 2010; Schwan, 2011; Walker et al., 2003)

A importância das doenças transmitidas pelas carraças é, geralmente, medida pela morbilidade e mortalidade causada, em termos de saúde pública estas desempenham um papel importante uma vez que os cães são hospedeiros importantes para a manutenção da população de carraças, principalmente devido à sua proximidade com populações humanas na condição de animal de companhia, o que proporciona condições para a infecção humana. No entanto as carraças também transmitem doenças a gado e estas podem resultar em problemas significativos nesta indústria. Nas famílias *Argasidae* e *Ixodidae*, cerca de 10% das espécies estão associadas à transmissão de agentes patogénicos a humanos e outros vertebrados. Estes agentes patogénicos podem ser responsáveis por várias doenças infecciosas como rickettsioses, borrelioses, ehrlichioses, tularémia, arboviroses, babesioses e outras patologias (Jongejan e Uilenberg, 2004; Rosa et al., 2006; Silva et al., 2006).

Algumas das doenças de maior relevância para a saúde pública podem ser observadas na tabela 1.1. (Silva et al., 2006)

O primeiro passo para o controlo das doenças transmitidas por carraças é a correcta identificação da carraça, no entanto em alguns casos a identificação morfológica é bastante difícil de modo que se tornou necessário complementar a identificação através de técnicas moleculares. O *DNA Barcoding* é um método que usa pequenos marcadores genéticos do DNA do organismo para identificar a espécie a que pertence. Idealmente estes marcadores devem: ter variabilidade inter-específica suficiente para discriminar cada espécie e manter um nível de variabilidade intra-específica baixo para não ser possível confundir dois organismos da mesma espécie com alguma variabilidade com dois organismos de espécies diferentes, deve ser usada a mesma região do DNA para diferentes grupos taxonómicos, devem ser bastante robustos com zonas bastante conservadas para os primers, e os marcadores não devem exceder os 800 pares de bases para facilitar a amplificação e sequenciação. A região 5' do gene de DNA mitocondrial, subunidade I da oxidase do citocromo C (COI) é um marcador por excelência para o *DNA Barcoding* (Lv et al., 2013) mas de modo a aumentar a robustez dos resultados é possível usar outros

marcadores como os genes 16S rDNA e 12S rDNA do DNA mitocondrial, estes três marcadores podem ser usados para a identificação das espécies das carrças (Lv et al., 2014, 2013; Mangold et al., 1998).

Tabela 1.1: Principais agentes patogénicos transmitidos ao homem por carrças. (Silva et al., 2006)

Agentes patogénicos	Doença	Distribuição geográfica	Principais vectores
<b>Vírus</b>			
Encefalite transmitida por carrça (TBE)	Meningoencefalite	Europa, Ásia	<i>Ixodes ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i>
Febre hemorrágica Crimeia-Congo (CCHF)	Febre hemorrágica	Europa, Ásia, África	<i>Hyalomma marginatum marginatum</i> , <i>H. m. rufipes</i> , <i>Haemaphysalis</i> spp.
Febre da carrça do Colorado (CTF)	Doença febril sistémica	América do Norte	<i>Dermacentor andersoni</i>
<b>Bactérias</b>			
<i>Rickettsias</i> <i>Rickettsia rickettsii</i>	Febre exantemática das Montanhas Rochosas	América do Norte Central e do Sul	<i>Dermacentor</i> spp. <i>Amblyomma</i> spp., <i>Rhipicephalus</i> spp.
<i>R. conorii</i>	Febre botonosa ou escaro-nodular	Sub-região Mediterrânica Ásia e África	<i>Rhipicephalus</i> spp., <i>Haemaphysalis</i> spp., <i>Amblyomma</i> spp., <i>Hyalomma</i> spp.
<i>R. japonica</i>	Febre exantemática oriental	Japão	<i>Haemaphysalis</i> spp.
<i>R. africae</i>	Febre da carrça africana	África	<i>Amblyomma hebraeum</i>
<i>R. slovaca</i>	Tibola (Linfadenopatia causada pela picada da carrça)	Europa	<i>Dermacentor marginatus</i>
<i>R. helvetica</i>	Perimicardite crónica	Europa	<i>Ixodes ricinus</i>
<i>Ehrlichias</i> <i>Ehrlichia chaffeensis</i> <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Ehrlichiose monocítica humana Ehrlichiose granulocítica humana (HGE)	EUA EUA Europa	<i>Amblyomma americanum</i> <i>Ixodes scapularis</i> <i>I. ricinus</i> ;
<i>Borrelias</i> <i>Borrelia burgdorferi</i> sl.	Borreliose de Lyme	EUA Europa África Austrália	<i>Ixodes scapularis</i> , <i>I. pacificus</i> <i>I. ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i> <i>I. persulcatus</i> <i>I. holocyclus</i>
Outras bactérias <i>Francisella tularensis</i>	Tuarémia	Europa, Ásia, África, América do Norte	<i>Haemaphysalis leporipalustris</i> , <i>Dermacentor marginatus</i> , <i>D. variabilis</i> , <i>D. andersoni</i> , <i>D. americanum</i>
<i>Coxiella burnetii</i>	Febre Q	Europa, Ásia, África, América do Norte	<i>Rhipicephalus</i> spp.
<b>Protozoários</b>			
<i>Babesias</i> <i>Babesia microti</i> <i>B. divergens</i>	Babesiose humana Babesiose humana	EUA Europa	<i>I. scapularis</i> <i>I. ricinus</i>

## 2 Objectivos

Os objectivos deste trabalho são:

- Pesquisar agentes patogénicos pertencentes aos géneros *Babesia* e *Hepatozoon*, e à família *Anaplasmataceae* em carraças dos géneros *Rhipicephalus*, *Ixodes*, *Dermacentor* e *Amblyomma*.
- Determinar o perfil genético dos agentes patogénicos encontrados.
- Avaliar a eficácia de amplificação dos primers usados para a caracterização molecular das carraças em estudo.
- Estudar as relações filogenéticas entre as várias espécies de carraças pertencentes ao género *Rhipicephalus*.

## 3 Material e Métodos

### 3.1 Amostragem

Foram estudados 65 espécimes, integrados na Colecção de Parasitologia do Instituto Superior de Agronomia (Universidade de Lisboa). O número de identificação (ID), a identificação morfológica, as datas e locais de colheita, hospedeiros e modo de preservação das amostras encontram-se na tabela 3.1. Nesta tabela: <sup>a</sup> indica que os espécimes foram recolhidos na vegetação com indícios de abrigo de javali (*Suis scrofa*); <sup>b</sup> indica que a extracção de DNA destes espécimes foi feita em trabalhos anteriores Coimbra-Dores et al., 2016, 2017 e Maia-Silva, 2017.



Tabela 3.1: Amostras biológicas (carraças) utilizadas neste trabalho onde **ID** corresponde ao registo de cada uma das amostras na Colecção de Parasitologia do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

ID	Identificação	Data de colheita	Local de colheita	Hospedeiro / Vegetação	Modo de Preservação
CV3039	<i>Rhipicephalus sp.</i>	1962	Cabo Verde	<i>Canis familiaris</i>	Etanol 70%
CV3040	<i>Rhipicephalus sp.</i>	1962	Cabo Verde	<i>Canis familiaris</i>	Etanol 70%
CV3041	<i>Rhipicephalus sp.</i>	1962	Cabo Verde	<i>Canis familiaris</i>	Etanol 70%
CV3042	<i>Rhipicephalus sp.</i>	1962	Cabo Verde	<i>Canis familiaris</i>	Etanol 70%
MOC3038	<i>R. simus</i>	1958	Moçambique	Antílope	Etanol 70% + Glicerol + Formol
MOC3043	<i>R. lunulatus</i>	1957	Moçambique	<i>Phacochoerus aethiopicus</i>	Etanol 70% + Glicerol + Formol
MOC3044	<i>R. simus</i>	1958	Moçambique	Antílope	Etanol 70% + Glicerol + Formol
O129 <sup>b</sup>	<i>Rhipicephalus sp.</i>	2008	Portugal	<i>Canis familiaris</i>	Etanol 70%
S336 <sup>b</sup>	<i>Rhipicephalus sp.</i>	2005	Portugal	<i>Canis familiaris</i>	Etanol 70%
S337 <sup>b</sup>	<i>Rhipicephalus sp.</i>	2005	Portugal	<i>Canis familiaris</i>	Etanol 70%
S344 <sup>b</sup>	<i>Rhipicephalus sp.</i>	2005	Portugal	<i>Canis familiaris</i>	Etanol 70%
S359 <sup>b</sup>	<i>Rhipicephalus sp.</i>	2005	Portugal	<i>Canis familiaris</i>	Etanol 70%
S475 <sup>b</sup>	<i>Rhipicephalus sp.</i>	2005	Portugal	<i>Canis familiaris</i>	Etanol 70%
S853 <sup>b</sup>	<i>Rhipicephalus sp.</i>	2005	Portugal	<i>Canis familiaris</i>	Etanol 70%
S943 <sup>b</sup>	<i>Rhipicephalus sp.</i>	2005	Portugal	<i>Canis familiaris</i>	Etanol 70%
S945 <sup>b</sup>	<i>Rhipicephalus sp.</i>	2005	Portugal	<i>Canis familiaris</i>	Etanol 70%
S1060 <sup>b</sup>	<i>Rhipicephalus sp.</i>	2005	Portugal	<i>Canis familiaris</i>	Etanol 70%
S333 <sup>b</sup>	<i>Rhipicephalus sp.</i>	2005	Portugal	<i>Canis familiaris</i>	Etanol 70%
S358 <sup>b</sup>	<i>Rhipicephalus sp.</i>	2005	Portugal	<i>Canis familiaris</i>	Etanol 70%
S435 <sup>b</sup>	<i>Rhipicephalus sp.</i>	2005	Portugal	<i>Canis familiaris</i>	Etanol 70%
S554 <sup>b</sup>	<i>Rhipicephalus sp.</i>	2005	Portugal	<i>Canis familiaris</i>	Etanol 70%
S630 <sup>b</sup>	<i>Rhipicephalus sp.</i>	2005	Portugal	<i>Canis familiaris</i>	Etanol 70%
S710 <sup>b</sup>	<i>Rhipicephalus sp.</i>	2005	Portugal	<i>Canis familiaris</i>	Etanol 70%
S1199 <sup>b</sup>	<i>Rhipicephalus sp.</i>	2005	Portugal	<i>Canis familiaris</i>	Etanol 70%
O208 <sup>b</sup>	<i>Rhipicephalus sp.</i>	2008	Portugal	<i>Canis familiaris</i>	Etanol 70%
CR1551 <sup>b</sup>	<i>Rhipicephalus sp.</i>	2005	Portugal	<i>Canis familiaris</i>	Etanol 70%
GB3052	<i>Boophilus geigyi</i>	2001	Guiné-Bissau	<i>Bos taurus</i>	Etanol 70%
GB3053	<i>Boophilus geigyi</i>	1992	Guiné-Bissau	<i>Bos taurus</i>	Etanol 70%
MOC3054	<i>R. appendiculatus</i>	1957	Moçambique	Antílope	Etanol 70% + Glicerol + Formol
MOC3055	<i>R. simus</i>	1957	Moçambique	Antílope	Etanol 70% + Glicerol + Formol
MOC3056	<i>R. planus</i>	1957	Moçambique	<i>Potamochoerus porcus</i>	Etanol 70% + Glicerol + Formol
GB3057	<i>R. senegalensis</i>	2008	Guiné-Bissau	Vegetação	Etanol 70%
GB3058	<i>R. senegalensis</i>	2008	Guiné-Bissau	Vegetação	Etanol 70%
GB3059	<i>R. senegalensis</i>	2008	Guiné-Bissau	Vegetação	Etanol 70%
GB3060	<i>R. senegalensis</i>	2008	Guiné-Bissau	Vegetação	Etanol 70%
Lx3079	<i>Ixodes sp.</i>	2016	Portugal	<i>Homo sapiens</i>	Etanol 70%
Larv_Ixodes	<i>I. ventralloi</i>	2015	Portugal	<i>Passer domesticus</i>	Etanol 70%
A3077	<i>Rhipicephalus sp.</i>	2009	Angola	<i>Canis familiaris</i>	Etanol 70%
A3078	<i>Rhipicephalus sp.</i>	2009	Angola	<i>Canis familiaris</i>	Etanol 70%
A3010 <sup>b</sup>	<i>R. evertsi mimeticus</i>	2008	Angola	<i>Bos taurus</i>	Etanol 70%
A3012 <sup>b</sup>	<i>R. duttoni</i>	2008	Angola	<i>Capra hircus</i>	Etanol 70%
A3013 <sup>b</sup>	<i>Rhipicephalus sp.</i>	2011	Angola	<i>Canis familiaris</i>	Etanol 70%
A3014 <sup>b</sup>	<i>Rhipicephalus sp.</i>	2011	Angola	<i>Canis familiaris</i>	Etanol 70%
A3015 <sup>b</sup>	<i>Rhipicephalus sp.</i>	2011	Angola	<i>Canis familiaris</i>	Etanol 70%
A3021 <sup>b</sup>	<i>Rhipicephalus sp.</i>	2011	Angola	<i>Canis familiaris</i>	Etanol 70%
A3022 <sup>b</sup>	<i>Rhipicephalus sp.</i>	2011	Angola	<i>Canis familiaris</i>	Etanol 70%
A3045 <sup>b</sup>	<i>Rhipicephalus sp.</i>	2011	Angola	<i>Canis familiaris</i>	Etanol 70%
A3087	<i>Rhipicephalus sp.</i>	2011	Angola	<i>Canis familiaris</i>	Etanol 70%
A3088	<i>Rhipicephalus sp.</i>	2011	Angola	<i>Canis familiaris</i>	Etanol 70%
CV3093	<i>Rhipicephalus sp.</i>	1994	Cabo Verde	<i>Canis familiaris</i>	Etanol 70%
CV3094	<i>Rhipicephalus sp.</i>	1992	Cabo Verde	<i>Canis familiaris</i>	Etanol 70%
CV3095	<i>Rhipicephalus sp.</i>	1992	Cabo Verde	<i>Canis familiaris</i>	Etanol 70%
A3102	<i>Rhipicephalus sp.</i>	2011	Angola	<i>Canis familiaris</i>	Etanol 70%
A3103	<i>Rhipicephalus sp.</i>	2011	Angola	<i>Canis familiaris</i>	Etanol 70%
SFAB17 M	<i>D. marginatus</i>	2017	Portugal	Vegetação <sup>a</sup>	Etanol 70%
SFAB17 F	<i>D. marginatus</i>	2017	Portugal	Vegetação <sup>a</sup>	Etanol 70%
SF3269	<i>R. sanguineus</i>	2017	Portugal	<i>Homo sapiens</i>	Etanol 70%
SF3270	<i>R. sanguineus</i>	2017	Portugal	<i>Homo sapiens</i>	Etanol 70%
SF3271	<i>R. sanguineus</i>	2017	Portugal	<i>Homo sapiens</i>	Etanol 70%
SF3519	<i>R. sanguineus</i>	2017	Portugal	<i>Canis familiaris</i>	Etanol 70%
SC3005 <sup>b</sup>	<i>R. sanguineus</i>	2017	Portugal	<i>Canis familiaris</i>	Etanol 70%
RAS3062 <sup>b</sup>	<i>R. simus</i>	2009	África do Sul	<i>Panthera leo</i>	Etanol 70%
CR1563 <sup>b</sup>	<i>R. sanguineus</i>	2005	Portugal	<i>Canis familiaris</i>	Etanol 70%
Zbw3063 <sup>b</sup>	<i>Amblyomma haebreum</i>	2010	África do Sul	<i>Syncerus caffer</i>	Etanol 70%
Zbw3064 <sup>b</sup>	<i>Amblyomma haebreum</i>	2010	África do Sul	<i>Syncerus caffer</i>	Etanol 70%

### 3.2 Extracção e avaliação da concentração de DNA de carraças

Sempre que se justificava (exemplares ainda não identificados morfológicamente) o DNA foi extraído das patas de apenas um dos lados da carraça de modo a preservar os caracteres morfológicos do lado oposto. Nas restantes amostras foram utilizados indivíduos inteiros. Para todas as amostras foi utilizado um kit comercial (E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit; Omega Bio-Tek, Inc., Norcross, GA, E.U.A.) de acordo com as instruções do fabricante. (Anexos – Protocolo 1).

Após extracção todas as amostras de DNA foram testadas no NanoDrop (NanoDrop 1000 Spectrophotometer) de modo a avaliar a concentração e o grau de pureza em relação a proteínas e fenóis.

### 3.3 Primers utilizados para caracterização molecular das carraças

Para a caracterização molecular foram escolhidos três marcadores, COI, 16S e 12S. A escolha destes primers deve-se ao seu uso com sucesso em trabalhos cujo objectivo era, também, a caracterização molecular de carraças e que comprovam a robustez destes marcadores como Almeida et al., 2017; Beati e Keirans, 2001; Black e Piesman, 1994; Chitimia et al., 2010; Lv et al., 2014, 2013.

Os pares de primers seleccionados para estes marcadores foram:

Tabela 3.2: Primers utilizados para caracterização molecular das carraças.

Marcador	Primer	Sequência	Referência
COI	LCO1490_F / HCO2198_R	5' GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG 3' 5' TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA 3'	(Folmer et al., 1994)
COI	Cox1F / Cox1R	5' GGAACAATATATTTTAATTTTGG 3' 5' ATCTATCCCTACTGTAAAATATATG 3'	(Chitimia et al., 2010)
16S	16S_F / 16S_R	5'CTGCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGTGG 3' 5' CCGGTCTGAACTCAGATCAAGT 3'	(Black e Piesman, 1994)
12S	12S_F / 12S_R	5' AAAGTAGGATTAGATACCCT 3' 5' AATGAGAGCGACGGGCGATGT 3'	(Beati e Keirans, 2001)

### 3.4 Amostras de carraças e marcadores moleculares utilizados

O marcador COI foi utilizado para as amostras: CV3039, CV3040, CV3041, CV3042, MOC3038, MOC3043, MOC3044, O129, S336, S337, S344, S359, S475, S853, S943, S945, S1060, S333, S358, S435, S554, S630, S710, S1199, O208, GB3052, GB3053, MOC3054, MOC3055, MOC3056, GB3057, GB3058, GB3059, GB3060, Lx3079, Larv\_Ixodes, A3077, A3078, A3087, A3088, CV3093, CV3094, CV3095, A3102, A3103, SF3269, SF3270, SF3271.

O marcador 16S foi utilizado para as amostras: CV3039, CV3040, CV3041, CV3042, MOC3038, MOC3043, MOC3044, S337, S344, S475, S943, S1060, S358, GB3052, GB3053, MOC3054, MOC3055, MOC3056, GB3057, GB3058, GB3059, GB3060, A3077, A3078. (As sequências das amostras CV3041 e CV3042 foram utilizadas em Coimbra-Dores et al., 2017)

O marcador 12S foi utilizado para as amostras: CV3039, CV3040, CV3041, CV3042, MOC3038, MOC3043, MOC3044, S337, S344, S475, S943, S1060, S358, GB3052, GB3053, MOC3054, MOC3055, MOC3056, GB3057, GB3058, GB3059, GB3060, A3077, A3078, A3087, A388, CV3093,

CV3094, CV3095, A3102, A3103. (As sequências das amostras CV3041 e CV3042 foram utilizadas em Coimbra-Dores et al., 2017)

### 3.5 DNA de carraças usado para pesquisa de agentes patogénicos

A pesquisa de agentes patogénicos foi feita no DNA de carraças que apresentaram resultados positivos em pelo menos um dos marcadores utilizados para a sua caracterização molecular de modo a excluir a hipótese de um resultado negativo se dever a um problema na extracção de DNA e ter a certeza que a não amplificação se deve à ausência do agente patogénico nos espécimes (Primers usados na pesquisa de agentes patogénicos estão descritos na tabela 3.3). As amostras utilizadas na pesquisa de agentes patogénicos estão descritas na tabela 3.4.

Amostras marcadas com <sup>a</sup> indicam que a extracção de DNA destes espécimes foi realizada por Coimbra-Dores e que estas amostras foram previamente usadas em Coimbra-Dores et al., 2017, 2016. <sup>b</sup> indica que a extracção de DNA destes espécimes foi realizada por Coimbra-Dores e que estas amostras foram usadas em Maia-Silva, 2017 com objectivos diferentes dos apresentados neste trabalho. <sup>c</sup> indica que a extracção de DNA destes espécimes foi realizada por Maia-Silva e que estas amostras foram usadas em Maia-Silva, 2017 com objectivos diferentes dos apresentados neste trabalho. A amostra GB3059 não foi utilizada com o par de primers EC16S pois o DNA foi esgotado com testes prévios. As amostras Zbw3063 e Zbw3064 foram usadas apenas para pesquisa de agentes patogénico dos géneros *Babesia* e *Hepatozoon* uma vez que o género *Amblyomma* é frequentemente associado a estes agentes patogénicos.

### 3.6 Pesquisa de agentes patogénicos

#### 3.6.1 Primers para pesquisa de agentes patogénicos

A escolha dos primers para a pesquisa de agentes patogénicos foi feita com base em Cardoso et al., 2016 dada a semelhança entre os objectivos desse trabalho com os objectivos desta Dissertação.

Tabela 3.3: Primers utilizados para pesquisa de agentes patogénicos.

Primer	Sequência	Referência
EC16S_F / EC16S_R	5' CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA 3' 5' AGAACGAACGCTGGCGGCAAGC 3'	(Rufino et al., 2013)
PP18S_F / PP18S_R	5' CCAGCAGCCGCGGTAATTC 3' 5' CTTTCGCAGTAGTTYGTCTTTAACAAATCT 3'	(Tabar et al., 2008)

*Tabela 3.4: Amostras que foram usadas para pesquisa de agentes patogênicos com o par de primers EC16S (16S da família Anaplasmataceae) e com o par de primers PP18S (18S dos gêneros Babesia e Hepatozoon). “V” significa que a amostra foi analisada para este marcador. Ausência de “V” significa que não foi analisada para este marcador.*

<b>ID</b>	<b>EC16S</b>	<b>PP18S</b>
CV3041	V	V
CV3042	V	V
S337 <sup>a</sup>	V	V
S344 <sup>a</sup>	V	V
S943 <sup>a</sup>	V	V
S1060 <sup>a</sup>	V	V
CR1551 <sup>b</sup>	V	V
GB3052	V	V
GB3058	V	V
GB3059		V
GB3060	V	V
Lx3079	V	V
Larv_Ixodes	V	V
A3010 <sup>a</sup>	V	V
A3012 <sup>a</sup>	V	V
A3013 <sup>a</sup>	V	V
A3014 <sup>a</sup>	V	V
A3015 <sup>a</sup>	V	V
A3021 <sup>a</sup>	V	V
A3022 <sup>a</sup>	V	V
A3045 <sup>a</sup>	V	V
SFAB17 M	V	V
SFAB17 F	V	V
SF3269	V	V
SF3270	V	V
SF3271	V	V
SF3519	V	V
SC3005 <sup>c</sup>	V	V
RAS3062 <sup>c</sup>	V	V
CR1563 <sup>b</sup>	V	V
Zbw3063 <sup>c</sup>		V
Zbw3064 <sup>c</sup>		V

### **3.7 Amplificação por PCR e Sequenciação**

#### **3.7.1 DNA de carraças**

O DNA extraído foi sujeito a PCR para amplificação dos fragmentos de DNA obtidos com primers específicos para os marcadores COI, 16S e 12S (Anexos – Protocolos 2, 3 e 4). Os produtos destes PCRs foram analisados por electroforese em gel de agarose (Anexos – Protocolo 5). Amostras escolhidas para sequenciação foram, posteriormente, purificadas com SureClean Plus Kit (Bioline Reagents Ltd. Londres – Reino Unido) segundo as instruções do fabricante (Anexos – Protocolo 6) e enviadas para STAB VIDA, Lda - Portugal para serem sequenciadas.

#### **3.7.2 DNA de agentes patogénicos**

As amostras que apresentassem resultados positivos foram sujeitas a PCR para a pesquisa de agentes patogénicos com os pares de primers EC16S e PP18S (Anexos – Protocolo 7). Os produtos destes PCRs foram analisados por electroforese em gel de agarose (Anexos – Protocolo 5). Amostras escolhidas para sequenciação foram, posteriormente, purificadas com SureClean Plus Kit (Bioline Reagents Ltd. Londres – Reino Unido) segundo as instruções do fabricante (Anexos – Protocolo 6) e enviadas para STAB VIDA, Lda - Portugal para serem sequenciadas.

### **3.8 Análise bioinformática e filogenética**

As sequências foram analisadas e tratadas com o software DNA Baser Assemble v4.36.0 (2016), Heracle Biosoft, [www.DnaBaser.com](http://www.DnaBaser.com).

Para uma análise filogenética mais robusta foram usadas sequências provenientes do Genbank para os diversos marcadores.

Todas as sequências foram então compiladas no software BioEdit version 7.2.5 (Hall, 2011) e depois alinhadas e tratadas no software MEGA7 version 7.0.26 (Kumar et al., 2016).

Para análise das relações filogenéticas das amostras foram criadas árvores filogenéticas recorrendo ao método estatístico *Maximum Parsimony*.

#### **3.8.1 Análise filogenética da família *Anaplasmataceae***

Para a análise filogenética da família *Anaplasmataceae* foram usadas sequências provenientes do Genbank pertencentes a esta família (EF139459, AF303467, AF156784, EF011110, AF536827, U26740, KF249822, KF249893, NR029162, NR074386, FM992372, AJ566640, U11016, AF178037, DQ365810), *Zymomonas mobilis* (Lindner, 1928) como *outgroup* (AF281034) e a sequência SFAB17 M obtida no presente trabalho.

#### **3.8.2 Análise filogenética da família *Sphingomonadaceae***

Para a análise filogenética da família *Sphingomonadaceae* foram usadas sequências provenientes do Genbank pertencentes a esta família (AJ863568, KY575150, DQ092757, EU781657, NR116018, GQ131578, EF424403, EF4244402, NR115118, DQ423478, AF281034, AF281032), *Ehrlichia canis* (Donatien & Lestoquard, 1935) como *outgroup* (U26740) e a sequência SFAB17 M obtida no presente trabalho.

#### **3.8.3 Análise filogenética do género *Sphingomonas* para determinação da espécie a que pertence a amostra SFAB17 M**

Para esta análise filogenética com o objectivo de determinar a espécie a que pertence a amostra detectada no espécime SFAB17 M foram usadas sequências provenientes do Genbank pertencentes ao género *Sphingomonas* (NR115491, NR113737, NR113761, NR113760, NR113840, NR026249, NR121736,

NR043962, NR112542, NR114119, NR113759, NR025363, NR134182, NR112027, NR025324) e a sequência SFAB17 M obtida no presente trabalho.

### 3.8.4 Análise filogenética do marcador COI

Para a análise filogenética do marcador COI foram usadas sequências provenientes do Genbank de *R. sanguineus* (KX757883, KX714599, KX757887, KX757901, KX757902, KX757904, KU568516, KX757910, AF081829, KX757893, KX757903, KX757909, KX757885, KX757906, KX757908, KX757915, KC243880, KX757911, KX757912, KM235720, KX714593, KX757914, KX360367, KX360403, KC243872, KC243873, KC243875, KC243876, KC243878, KC243879), *R. pumilio* (HM193877, HM193878), *R. rossicus* (KX757897, KX757896), *R. turanicus* (KX757894, KX757886, KX757891, KY606299, KC243913, AF132841, KC243918, KY069271, MF002577, KY606288, KM235718), *R. guilhoni* (KC243897, KC243898), *R. pusillus* (KU556747, KC243901), *R. haemaphysaloides* (KM083593, JQ737085), *R. muhsamae* (KC243923, KC243924), *R. appendiculatus* (KU725899, MF133499, DQ901361, DQ901360, KU725890, DQ901356, DQ901357, DQ901358, AF132833), *R. bursa* (KC243927, KM494913, KF219740), *R. annulatus* (KX228533, KF219737, KY678123), *R. microplus* (KP698516, KP792578, KU664523, KX228541, KY373260, KP792593, KP792572), *R. decoloratus* (KY678130, KY678131), *R. geigy* (NC023350, KU568512) e *O. faccini* como *outgroup* (KY678235).

### 3.8.5 Análise filogenética do marcador 16S

Para a análise filogenética do marcador 16S foram usadas sequências provenientes do Genbank de *R. sanguineus* (KT382451, KT382449, KT382456, KT382457, KT382462, KT382463, KT382472, KT382475, DQ093297, KU664368, KU746973, KX793743, KT382448, KX793746, KX793740, KT382455, KX413794, GU553082, KX793742, KX793735, KX793726, KT382477, KX793738, KX793734, KT382470, KT382452, KT382474), *R. guilhoni* (KC243851, KC243854), *R. turanicus* (KX793721, KC243867, KY583081, KX793728, KC243864), *R. haemaphysaloides* (KC170743, KU664522), *R. simus* (KY413799, KJ613641), *R. muhsamae* (KC243870, KY111471, KY111458), *R. rossicus* (KY111472, KX793733), *R. pusillus* (KY231932, KC243855), *R. maculatus* (KP858499, KY413797), *R. bursa* (AJ002956, KU664351), *R. geigy* (KC503263, KF569942), *R. microplus* (EU918189, KC503255, EU918191, EU918186, KP210050, KP210059, EU918188, KX450285, KP143546, KC170742, EU918187, EU918184, EU918183, EU918182, EU918181, EU918180, EU918179, EU918178, EU918177, EU918176), *O. savignyi* como *outgroup* (KJ133576) e as sequências CV3041 e CV3042 (Coimbra-Dores et al., 2017) obtidas no presente trabalho.

### 3.8.6 Análise filogenética do marcador 12S

Para a análise filogenética do marcador 12S foram usadas sequências provenientes do Genbank de *R. sanguineus* (KT382485, KT382483, KT382490, KT382491, KT382496, KT382497, KT382506, KT382509, KT382510, KC018073, KC018074, KC018075, KY413803, KU746974, KC018070, KY413801, KY413804, KY413802, KT382489, KU556696, KT382511, KT382504, KT382508, KT382486, KU556695), *R. turanicus* (DQ901290, AF150017, AF150013, MF002567, KT382479, FJ536579, KC243826, AM410571, KC243816, KY413805, KF145151), *R. sulcatus* (KU568504, FJ536564), *R. pumilio* (AF150023), *R. rossicus* (KJ425484, AF150021), *R. appendiculatus* (AF150027, DQ849203, DQ849234), *R. zambeziensis* (DQ849219, DQ849220), *R. pulchellus* (AF150024, AF031864), *R. geigy* (KU568501, KC503263, KF569939), *R. bursa* (AF150053, KY595784, KC243833), *R. decoloratus* (AF150044, EU921774, KF569940), *R. annulatus* (KU568498, AM410573, EU921773), *R. pusillus* (AF150022, FJ536547), *R. microplus* (KU664530, EU921772, EU921771, KC503255, EU921767, KP143546, AF150045, EU921758, EU921759, EU921760, EU921762, EU921761, EU921763, EU921764, EU921765, EU921766), *O. tholozani* como *outgroup*

(KC431888) e as sequências CV3041 e CV3042 (Coimbra-Dores et al., 2017) obtidas no presente trabalho.

## 4 Resultados

Extraíu-se o DNA às amostras processadas, posteriormente foi feita uma caracterização molecular utilizando três marcadores, COI, 16S e 12S. As amostras que apresentaram um resultado positivo no PCR para pelo menos um destes marcadores foram testadas para a presença de agentes patogénicos (Tabela 3.4). Amostras cujo DNA já tinha sido extraído e que foram usadas em trabalhos distintos (Tabela 3.4) também foram sujeitas ao mesmo processo de detecção de agentes patogénicos.

As amostras sequenciadas com sucesso foram posteriormente utilizadas para uma análise filogenética de modo a fazer a sua identificação específica.

### 4.1 Pesquisa de agentes patogénicos com os primers EC16S e PP18S

Estes resultados representam a quantidade de amostras que, após terem sido seleccionadas para fazer uma pesquisa de agentes patogénicos (Tabela 3.4), apresentaram resultados positivos ou negativos.

Tabela 4.1: Resumo das amostras positivas / negativas para a detecção de Agentes Patogénicos

Marcador	Amostras positivas	Amostras negativas
EC16S	9	20
PP18S	4	28

De acordo com as amostras que apresentaram resultados positivos para a detecção de agentes patogénicos (Tabela 4.1) pertencentes à família *Anaplasmataceae* e aos géneros *Babesia* e *Hepatozoon* relativamente ao par de primers EC16S\_F / EC16S\_R (Figura 4.1a) e PP18S\_F / PP18S\_R (Figura 4.1b), apenas em 31% e 12%, respectivamente, foi possível a detecção de agentes patogénicos.

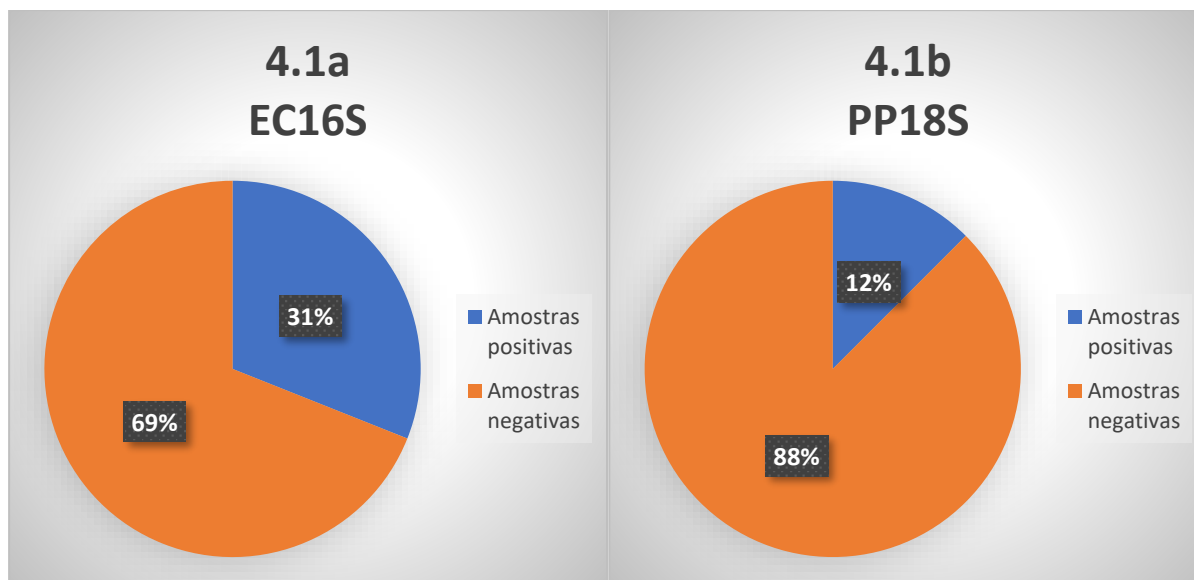


Figura 4.1: a) Percentagem de amostras que apresentaram resultados positivos para a pesquisa de agentes patogénicos com os primers EC16S\_F / EC16S\_R. b) Percentagem de amostras que apresentaram resultados positivos para a pesquisa de agentes patogénicos com os primers PP18S\_F / PP18S\_R.



## 4.2 Identificação da sequência obtida de agentes patogênicos

Apenas a amostra SFAB17 M foi sequenciada após um resultado positivo para a pesquisa de agentes patogênicos pertencentes à família *Anaplasmataceae*. Esta sequência foi depois processada e foi feito um *Blastn* para identificação específica do agente patogênico detectado. Na figura 4.2 é possível observar os resultados deste *Blastn* organizado pela taxonomia dos resultados.

Organism	Blast Name	Score	Number of Hits	Description
Bacteria	bacteria		109	
. Alphaproteobacteria	a-proteobacteria		51	
. . Sphingomonadaceae	a-proteobacteria		26	
. . . Sphingomonas	a-proteobacteria		23	
. . . . Sphingomonas sp.	a-proteobacteria	811	1	<a href="#">Sphingomonas sp. hits</a>
. . . . Sphingomonas sp. MN 57.2	a-proteobacteria	811	1	<a href="#">Sphingomonas sp. MN 57.2 hits</a>
. . . . uncultured Sphingomonas sp.	a-proteobacteria	808	4	<a href="#">uncultured Sphingomonas sp. hits</a>
. . . . Sphingomonas sp. 86(2005)	a-proteobacteria	806	1	<a href="#">Sphingomonas sp. 86(2005) hits</a>
. . . . Sphingomonas leidyi	a-proteobacteria	800	12	<a href="#">Sphingomonas leidyi hits</a>
. . . . Sphingomonas sp. MN57.2a	a-proteobacteria	787	1	<a href="#">Sphingomonas sp. MN57.2a hits</a>
. . . . Sphingomonas kyeonqiensis	a-proteobacteria	761	2	<a href="#">Sphingomonas kyeonqiensis hits</a>
. . . . Sphingomonas sp. X7(2010)	a-proteobacteria	761	1	<a href="#">Sphingomonas sp. X7(2010) hits</a>
. . . Sphingomonadaceae bacterium SAP53_3	a-proteobacteria	800	1	<a href="#">Sphingomonadaceae bacterium SAP53_3 hits</a>
. . . Caulobacter subvibrioides CB81	a-proteobacteria	793	1	<a href="#">Caulobacter subvibrioides CB81 hits</a>
. . . uncultured Sphingomonadaceae bacterium	a-proteobacteria	784	1	<a href="#">uncultured Sphingomonadaceae bacterium hits</a>
. . uncultured alpha proteobacterium	a-proteobacteria	811	11	<a href="#">uncultured alpha proteobacterium hits</a>
. . uncultured Caulobacter sp.	a-proteobacteria	811	5	<a href="#">uncultured Caulobacter sp. hits</a>
. . alpha proteobacterium PI_GH4.1.G4	a-proteobacteria	811	1	<a href="#">alpha proteobacterium PI_GH4.1.G4 hits</a>
. . Caulobacteraceae bacterium C1	a-proteobacteria	800	1	<a href="#">Caulobacteraceae bacterium C1 hits</a>
. . Caulobacteraceae bacterium C2	a-proteobacteria	800	1	<a href="#">Caulobacteraceae bacterium C2 hits</a>
. . Caulobacteraceae bacterium C3	a-proteobacteria	800	1	<a href="#">Caulobacteraceae bacterium C3 hits</a>
. . alpha proteobacterium PI_GH4.1.H5	a-proteobacteria	800	1	<a href="#">alpha proteobacterium PI_GH4.1.H5 hits</a>
. . Caulobacter endosymbiont of Tetranichus urticae	a-proteobacteria	800	1	<a href="#">Caulobacter endosymbiont of Tetranichus urticae hits</a>
. . Asticcacaulis biprosthecium	a-proteobacteria	795	1	<a href="#">Asticcacaulis biprosthecium hits</a>
. . Caulobacter sp. HWE-A10	a-proteobacteria	789	1	<a href="#">Caulobacter sp. HWE-A10 hits</a>
. . Asticcacaulis excentricus CB 48	a-proteobacteria	789	1	<a href="#">Asticcacaulis excentricus CB 48 hits</a>
. . uncultured bacterium	bacteria	811	49	<a href="#">uncultured bacterium hits</a>
. . uncultured marine bacterium	bacteria	808	4	<a href="#">uncultured marine bacterium hits</a>
. . bacterium RA003	bacteria	800	1	<a href="#">bacterium RA003 hits</a>
. . unidentified marine bacterioplankton	bacteria	800	2	<a href="#">unidentified marine bacterioplankton hits</a>
. . uncultured soil bacterium	bacteria	767	2	<a href="#">uncultured soil bacterium hits</a>

Figura 4.2: Resultados do Blastn da sequência obtida organizados de acordo com a sua taxonomia.

Era esperado que a amostra SFAB17 M pertencesse a um organismo da família *Anaplasmataceae*, portanto fez-se um estudo filogenético, obtido através do método estatístico *Maximum Likelihood*, da família *Anaplasmataceae* (Figura 4.3) usando como *outgroup* uma sequência pertencente à família *Sphingomonadaceae*.

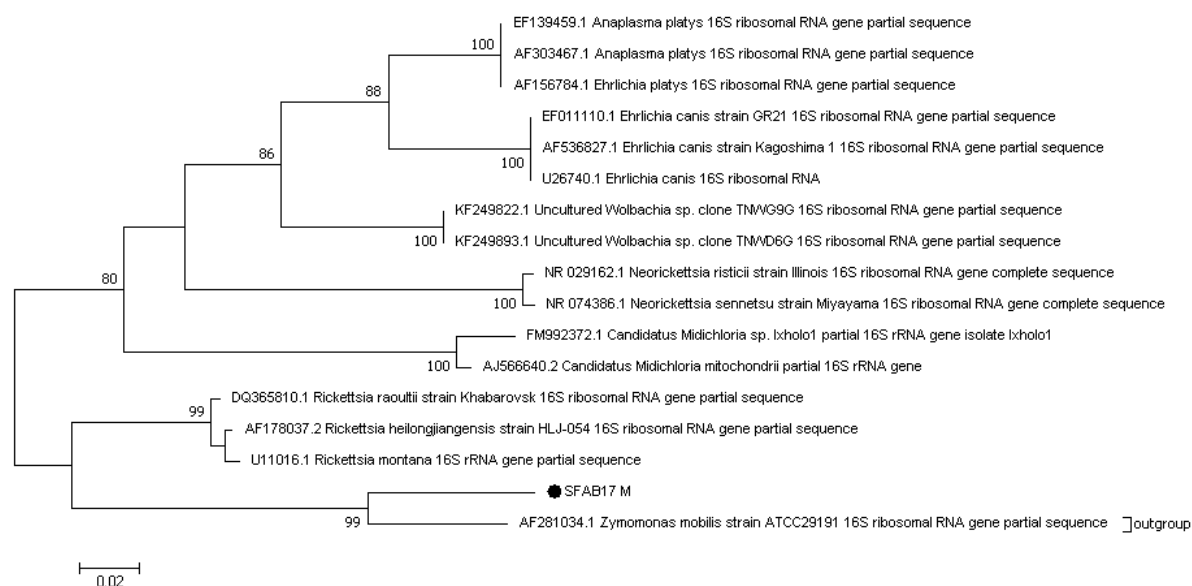


Figura 4.3: Filogenia da família *Anaplasmataceae* obtida através do marcador 16S (Primers EC16S\_F / EC16S\_R). Árvore filogenética inferida pelo método *Maximum Likelihood* baseado no modelo Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993). Os números representam a percentagem de árvores em que os taxa associados ficaram juntos depois de 1000 simulações (valores abaixo de 75% foram omitidos). As amostras com um círculo fechado foram obtidas neste trabalho.

Os resultados apresentados na figura 4.3 sugerem que a amostra SFAB17 M pertence à família *Sphingomonadaceae* portanto fez-se um estudo filogenético, obtido através do método estatístico *Maximum Likelihood*, da família *Sphingomonadaceae* (Figura 4.4) usando como *outgroup* uma sequência pertencente à família *Anaplasmataceae*.

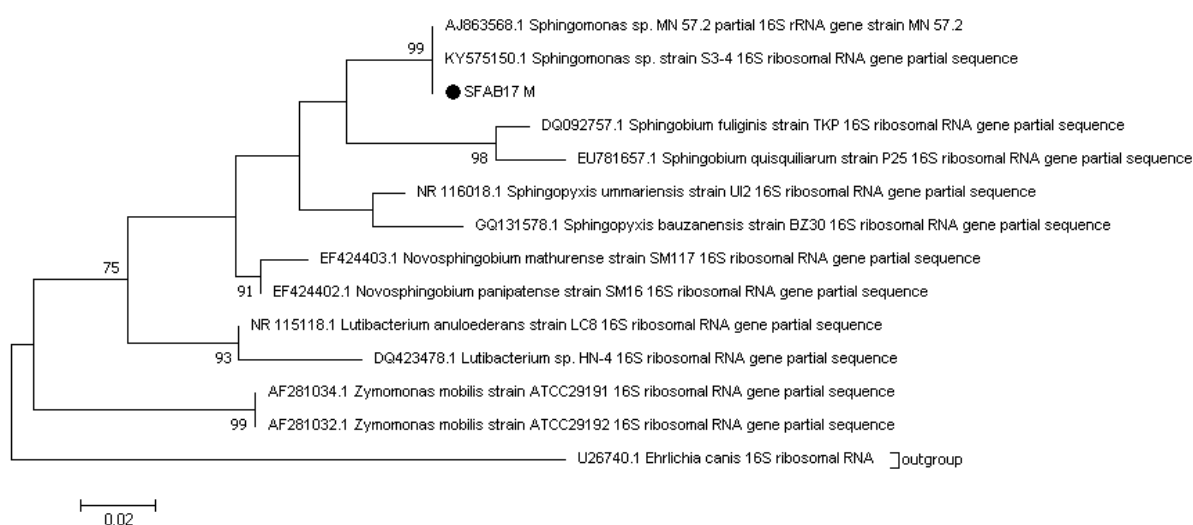


Figura 4.4: Filogenia da família *Sphingomonadaceae* obtida através do marcador 16S (Primers EC16S\_F / EC16S\_R). Árvore filogenética inferida pelo método *Maximum Likelihood* baseado no modelo Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993). Os números representam a percentagem de árvores em que os taxa associados ficaram juntos depois de 1000 simulações (valores abaixo de 75% foram omitidos). As amostras com um círculo fechado foram obtidas neste trabalho.

Os resultados obtidos nas figuras 4.3 e 4.4 sugerem que a amostra SFAB17 M pertence à família *Sphingomonadaceae* e não à família *Anaplasmataceae*. De modo a determinar a espécie desta amostra fez-se estudo filogenético, obtido através do método estatístico *Maximum Likelihood*, dos resultados de um *Blastn* com uma identidade superior a 95% com a amostra SFAB17 M e direcionado para a família *Sphingomonadaceae* (Figura 4.5).

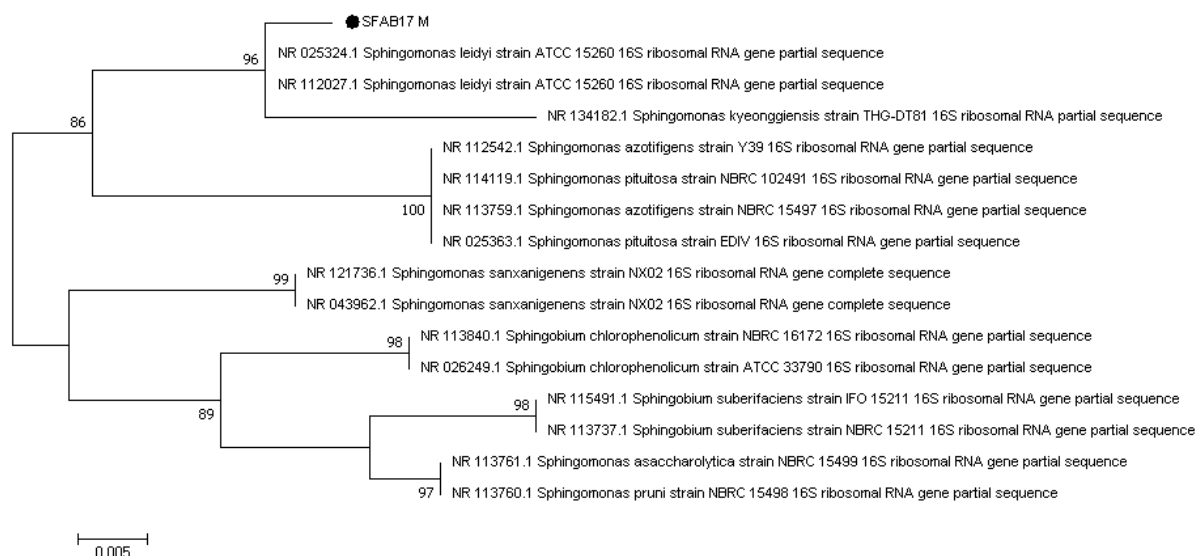


Figura 4.5: Filogenia do género *Sphingomonas* obtida através do marcador 16S (Primers EC16S\_F / EC16S\_R) e usando apenas sequências obtidas num *Blastn* para este género com uma identidade superior a 95% com a amostra SFAB17M. Árvore filogenética inferida pelo método *Maximum Likelihood* baseado no modelo Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993). Os números representam a percentagem de árvores em que os taxa associados ficaram juntos depois de 1000 simulações (valores abaixo de 75% foram omitidos). As amostras com um círculo fechado foram obtidas neste trabalho.

Após estes resultados inesperados (Amostra SFAB17 M pertencer à família *Sphingomonadaceae* e não à família *Anaplasmataceae*, como inicialmente previsto) foi feito um *Blastn* do par de primers usados para a detecção de agentes patogênicos da família *Anaplasmataceae* de modo a tentar perceber se são específicos para esta família. As figuras 4.6 e 4.7 mostram os resultados deste *Blastn* aos primers EC16S\_F e EC16S\_R, respectivamente.

Organism	Blast Name	Score	Number of Hits	Description
<a href="#">Bacteria</a>	<a href="#">bacteria</a>		100	
• <a href="#">Proteobacteria</a>	<a href="#">proteobacteria</a>		58	
• • <a href="#">Betaproteobacteria</a>	<a href="#">b-proteobacteria</a>		5	
• • • <a href="#">Burkholderiaceae</a>	<a href="#">b-proteobacteria</a>		2	
• • • • <a href="#">Ralstonia solanacearum</a>	<a href="#">b-proteobacteria</a>	44.1	1	<a href="#">Ralstonia solanacearum hits</a>
• • • • <a href="#">Burkholderia sp.</a>	<a href="#">b-proteobacteria</a>	44.1	1	<a href="#">Burkholderia sp. hits</a>
• • • <a href="#">uncultured beta proteobacterium</a>	<a href="#">b-proteobacteria</a>	44.1	3	<a href="#">uncultured beta proteobacterium hits</a>
• <a href="#">Neptunomonas sp. BZm-1</a>	<a href="#">g-proteobacteria</a>	44.1	1	<a href="#">Neptunomonas sp. BZm-1 hits</a>
• <a href="#">Alteromonas sp. BZmE-A8</a>	<a href="#">g-proteobacteria</a>	44.1	1	<a href="#">Alteromonas sp. BZmE-A8 hits</a>
• <a href="#">Pseudoalteromonas sp. BZmE-A7</a>	<a href="#">g-proteobacteria</a>	44.1	1	<a href="#">Pseudoalteromonas sp. BZmE-A7 hits</a>
• <a href="#">Alteromonas sp. BZmE-A6</a>	<a href="#">g-proteobacteria</a>	44.1	1	<a href="#">Alteromonas sp. BZmE-A6 hits</a>
• <a href="#">Pseudoalteromonas sp. BZmE-A4</a>	<a href="#">g-proteobacteria</a>	44.1	1	<a href="#">Pseudoalteromonas sp. BZmE-A4 hits</a>
• <a href="#">Vibrio sp. BZmE-A3</a>	<a href="#">g-proteobacteria</a>	44.1	1	<a href="#">Vibrio sp. BZmE-A3 hits</a>
• <a href="#">Alteromonas sp. BZmE-A10</a>	<a href="#">g-proteobacteria</a>	44.1	1	<a href="#">Alteromonas sp. BZmE-A10 hits</a>
• <a href="#">uncultured gamma proteobacterium</a>	<a href="#">g-proteobacteria</a>	44.1	5	<a href="#">uncultured gamma proteobacterium hits</a>
• <a href="#">uncultured alpha proteobacterium</a>	<a href="#">a-proteobacteria</a>	44.1	10	<a href="#">uncultured alpha proteobacterium hits</a>
• <a href="#">uncultured Epsilonproteobacteria bacterium</a>	<a href="#">e-proteobacteria</a>	44.1	2	<a href="#">uncultured Epsilonproteobacteria bacterium hits</a>
• <a href="#">Salmonella enterica</a>	<a href="#">enterobacteria</a>	44.1	1	<a href="#">Salmonella enterica hits</a>
• <a href="#">Escherichia fergusonii</a>	<a href="#">enterobacteria</a>	44.1	1	<a href="#">Escherichia fergusonii hits</a>
• <a href="#">Acidithiobacillus sp.</a>	<a href="#">proteobacteria</a>	44.1	1	<a href="#">Acidithiobacillus sp. hits</a>
• <a href="#">Agrobacterium sp.</a>	<a href="#">a-proteobacteria</a>	44.1	3	<a href="#">Agrobacterium sp. hits</a>
• <a href="#">Pantoea sp.</a>	<a href="#">enterobacteria</a>	44.1	1	<a href="#">Pantoea sp. hits</a>
• <a href="#">Agrobacterium tumefaciens</a>	<a href="#">a-proteobacteria</a>	44.1	1	<a href="#">Agrobacterium tumefaciens hits</a>
• <a href="#">Erwinia sp.</a>	<a href="#">enterobacteria</a>	44.1	1	<a href="#">Erwinia sp. hits</a>
• <a href="#">Shewanella putrefaciens</a>	<a href="#">g-proteobacteria</a>	44.1	1	<a href="#">Shewanella putrefaciens hits</a>
• <a href="#">Aeromonas veronii</a>	<a href="#">g-proteobacteria</a>	44.1	1	<a href="#">Aeromonas veronii hits</a>
• <a href="#">uncultured Brevundimonas sp.</a>	<a href="#">a-proteobacteria</a>	44.1	12	<a href="#">uncultured Brevundimonas sp. hits</a>
• <a href="#">uncultured Caulobacter sp.</a>	<a href="#">a-proteobacteria</a>	44.1	1	<a href="#">uncultured Caulobacter sp. hits</a>
• <a href="#">uncultured Skermanella sp.</a>	<a href="#">a-proteobacteria</a>	44.1	1	<a href="#">uncultured Skermanella sp. hits</a>
• <a href="#">uncultured Escherichia/Shigella sp.</a>	<a href="#">enterobacteria</a>	44.1	1	<a href="#">uncultured Escherichia/Shigella sp. hits</a>
• <a href="#">uncultured Bosea sp.</a>	<a href="#">a-proteobacteria</a>	44.1	1	<a href="#">uncultured Bosea sp. hits</a>
• <a href="#">uncultured Sphingomonas sp.</a>	<a href="#">a-proteobacteria</a>	44.1	1	<a href="#">uncultured Sphingomonas sp. hits</a>
• <a href="#">uncultured Stenotrophomonas sp.</a>	<a href="#">g-proteobacteria</a>	44.1	1	<a href="#">uncultured Stenotrophomonas sp. hits</a>
• <a href="#">Staphylococcus sp. BZmE-A1</a>	<a href="#">firmicutes</a>	44.1	1	<a href="#">Staphylococcus sp. BZmE-A1 hits</a>
• <a href="#">uncultured Bacteroides sp.</a>	<a href="#">CFB group bacteria</a>	44.1	2	<a href="#">uncultured Bacteroides sp. hits</a>
• <a href="#">uncultured Sphingobacterium sp.</a>	<a href="#">CFB group bacteria</a>	44.1	4	<a href="#">uncultured Sphingobacterium sp. hits</a>
• <a href="#">uncultured planctomycete</a>	<a href="#">planctomycetes</a>	44.1	1	<a href="#">uncultured planctomycete hits</a>
• <a href="#">Bacillus sp.</a>	<a href="#">firmicutes</a>	44.1	15	<a href="#">Bacillus sp. hits</a>

Figura 4.6: Resultados do Blastn da sequência do primer EC16S\_F organizados de acordo com a sua taxonomia.

Organism	Blast Name	Score	Number of Hits	Description
Bacteria	bacteria		115	
Proteobacteria	proteobacteria		111	
Alphaproteobacteria	a-proteobacteria		108	
Anaplasmataceae	a-proteobacteria		107	
Anaplasma	a-proteobacteria		91	
uncultured Anaplasma sp.	a-proteobacteria	44.1	50	uncultured Anaplasma sp. hits
Anaplasma marginale	a-proteobacteria	44.1	4	Anaplasma marginale hits
Anaplasma ovis	a-proteobacteria	44.1	3	Anaplasma ovis hits
Anaplasma platys	a-proteobacteria	44.1	7	Anaplasma platys hits
Anaplasma sp. Mongolia 6	a-proteobacteria	44.1	1	Anaplasma sp. Mongolia 6 hits
Anaplasma phagocytophilum str. Norway variant2	a-proteobacteria	44.1	1	Anaplasma phagocytophilum str. Norway variant2 hits
Anaplasma sp. (ex Haemaphysalis longicornis)	a-proteobacteria	44.1	5	Anaplasma sp. (ex Haemaphysalis longicornis) hits
Anaplasma capra	a-proteobacteria	44.1	4	Anaplasma capra hits
Anaplasma bovis	a-proteobacteria	44.1	15	Anaplasma bovis hits
Anaplasma sp. A60	a-proteobacteria	44.1	1	Anaplasma sp. A60 hits
Ehrlichia minasensis	a-proteobacteria	44.1	1	Ehrlichia minasensis hits
uncultured Ehrlichia sp.	a-proteobacteria	44.1	5	uncultured Ehrlichia sp. hits
Ehrlichia chaffeensis	a-proteobacteria	44.1	2	Ehrlichia chaffeensis hits
Ehrlichia canis	a-proteobacteria	44.1	7	Ehrlichia canis hits
Ehrlichia sp. BL116-8	a-proteobacteria	44.1	1	Ehrlichia sp. BL116-8 hits
Candidatus Tokpelaia hoelldoblerii	a-proteobacteria	44.1	1	Candidatus Tokpelaia hoelldoblerii hits
uncultured delta proteobacterium	d-proteobacteria	44.1	1	uncultured delta proteobacterium hits
uncultured Coxiella sp.	g-proteobacteria	44.1	2	uncultured Coxiella sp. hits
uncultured bacterium	bacteria	44.1	4	uncultured bacterium hits

Figura 4.7: Resultados do Blastn da sequência do primer EC16S\_R organizados de acordo com a sua taxonomia.

### 4.3 Eficácia de amplificação dos marcadores usados para caracterização molecular:

Estes resultados foram obtidos através da razão entre as amostras que apresentaram amplificação com os primers de cada marcador (Tabela 3.2) e o total de amostras que foram sujeitas a amplificação por PCR com os mesmos primers (Tabela 4.2). A representação gráfica destes resultados está representada na figura 4.2.

Tabela 4.2: Resumo da eficácia dos marcadores COI, 16S e 12S no total das amostras

Total de amostras			
Marcador	Amostras amplificadas	Amostras não amplificadas	% de amplificação
COI	19	29	39,58
16S	15	9	62,50
12S	16	15	51,61

A eficácia de amplificação dos marcadores usados na caracterização molecular, obtida através da razão entre as amostras que apresentaram amplificação com o respectivo primer e o total de amostras que foram sujeitas a amplificação por PCR com os mesmos primers, foi de 40%, 62% e 52% para o COI, 16S e 12S, respectivamente.

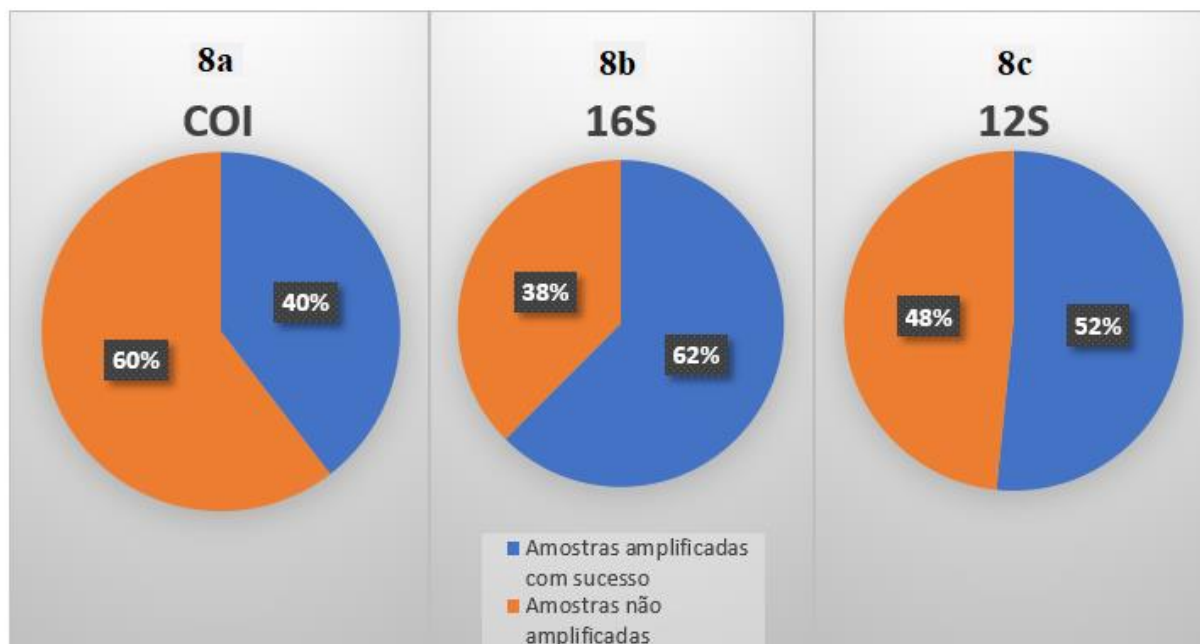


Figura 4.8: a) Eficácia da amplificação das amostras com o marcador COI. b) Eficácia da amplificação das amostras com o marcador 16S. c) Eficácia da amplificação das amostras com o marcador 12S.

#### 4.4 Filogenia do género *Rhipicephalus*

Na figura 4.9 estão os resultados de um estudo filogenético, obtidos pelo método estatístico *Maximum Likelihood*, para a determinação das relações filogenéticas entre as várias espécies do género *Rhipicephalus* utilizando várias sequências obtidas do Genbank do marcador COI de várias espécies.

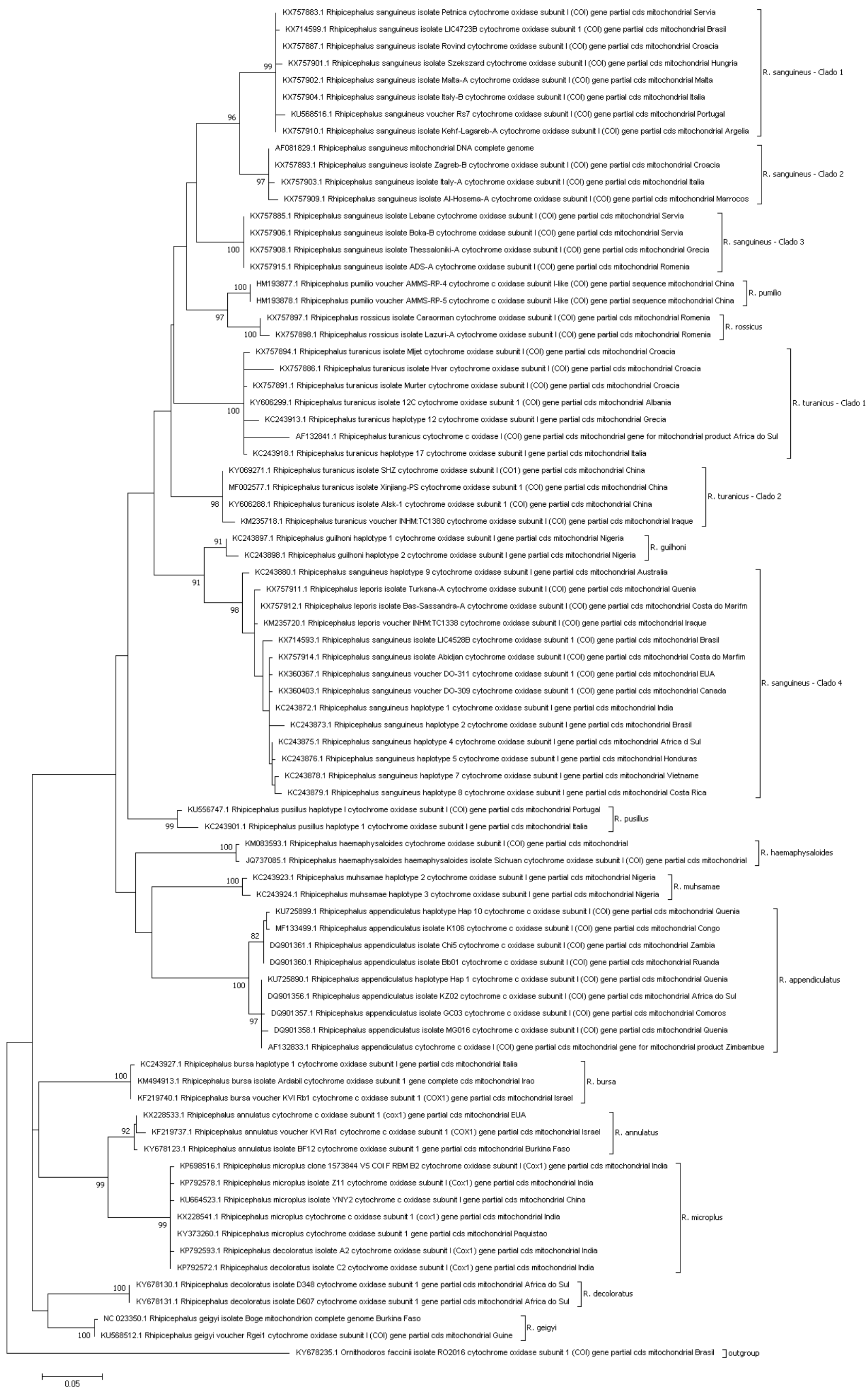


Figura 4.9: Filogenia do género *Rhipicephalus* obtida através do marcador COI. Árvore filogenética inferida pelo método Maximum Likelihood baseado no modelo Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993). Os números representam a percentagem de árvores em que os taxa associados ficaram juntos depois de 1000 simulações (valores abaixo de 75% foram omitidos).

Para perceber melhor a distribuição geográfica das diferentes espécies identificadas como *R. sanguineus* (de acordo com a figura 4.9) foi marcado no seguinte mapa (Figura 4.10) a localização da recolha de cada exemplar.

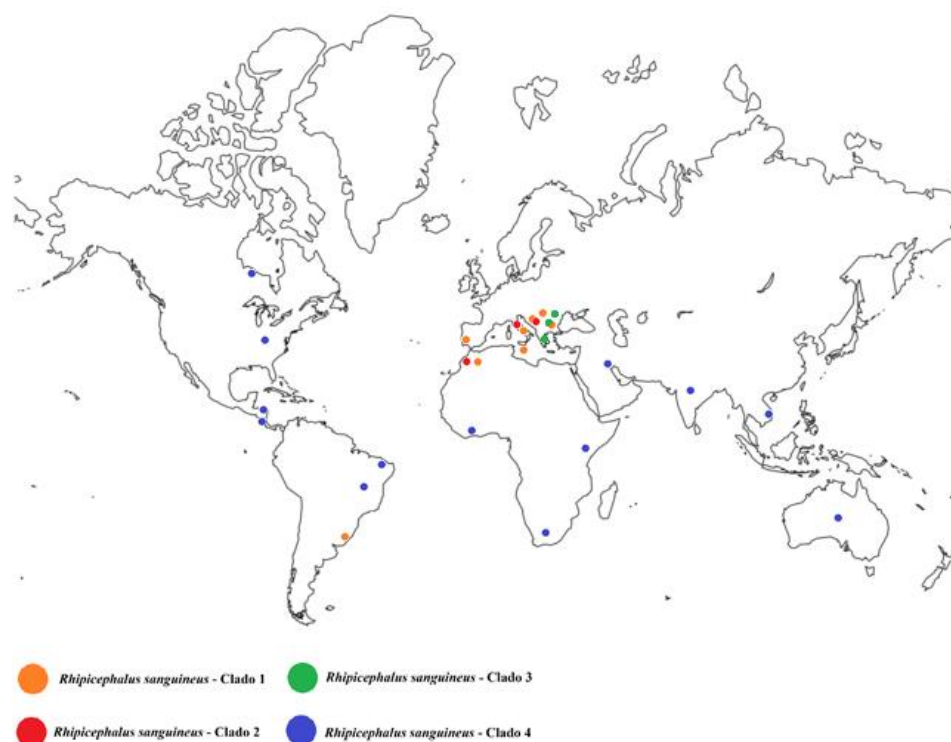


Figura 4.10: Distribuição geográfica das amostras pertencentes aos quatro clados de *R. sanguineus* obtidos através da análise filogenética do marcador *COI*.

Na figura 4.11 estão os resultados de um estudo filogenético, obtidos pelo método estatístico *Maximum Likelihood*, para a determinação das relações filogenéticas entre as várias espécies do género *Rhipicephalus* usando várias sequências obtidas do Genbank do marcador 16S de várias espécies. As sequências obtidas das amostras CV3041 e CV3042 foram incluídas neste estudo.



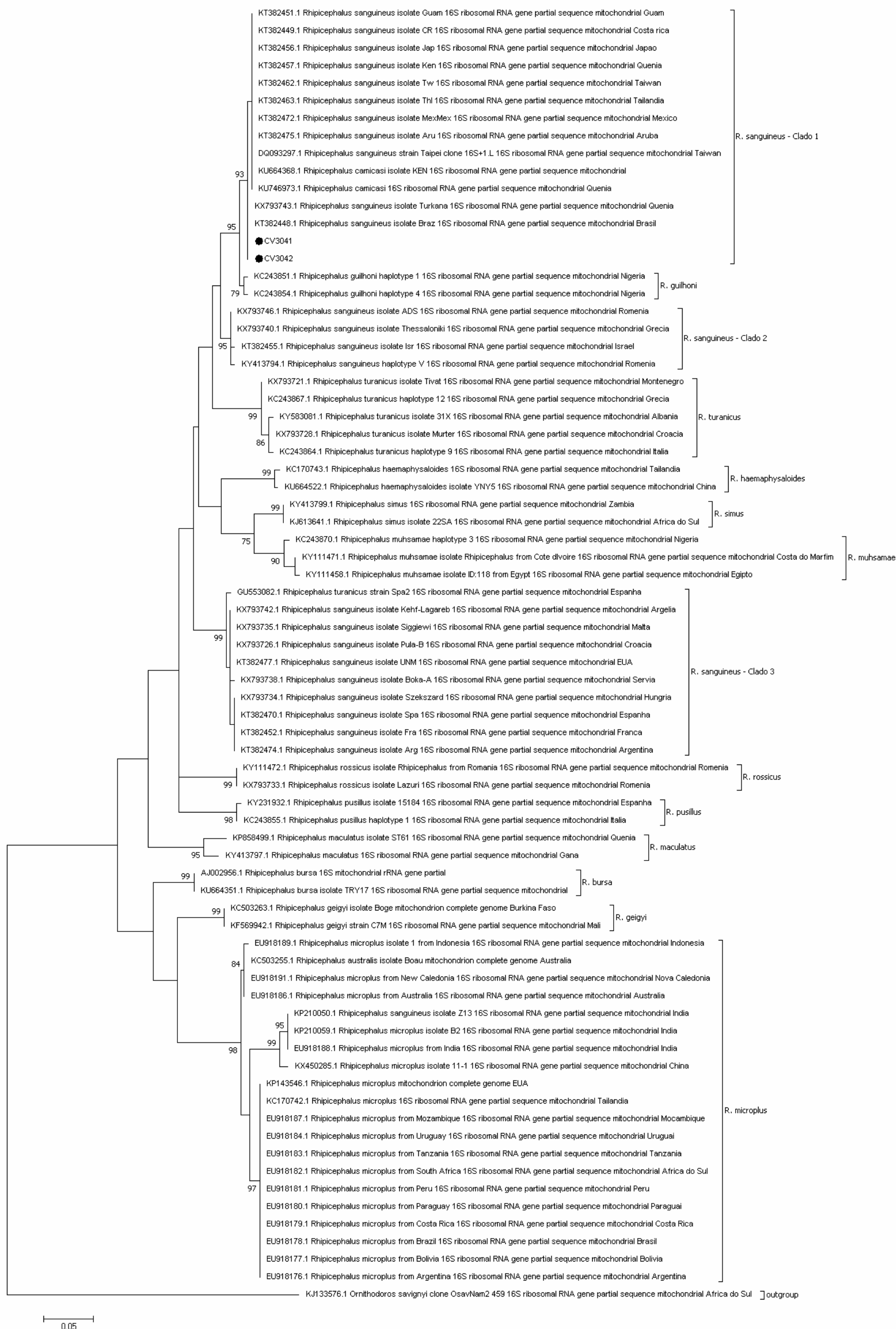


Figura 4.11: Filogenia do gênero *Rhipicephalus* obtida através do marcador 16S. Árvore filogenética inferida pelo método Maximum Likelihood baseado no modelo Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993). Os números representam a percentagem de árvores em que os taxa associados ficaram juntos depois de 1000 simulações (valores abaixo de 75% foram omitidos). As amostras marcadas com um círculo fechado foram obtidas neste trabalho.

Para perceber melhor a distribuição geográfica das diferentes espécies identificadas como *R. sanguineus* (de acordo com a figura 4.11) foi marcado no seguinte mapa (Figura 4.12) a localização da recolha de cada exemplar.

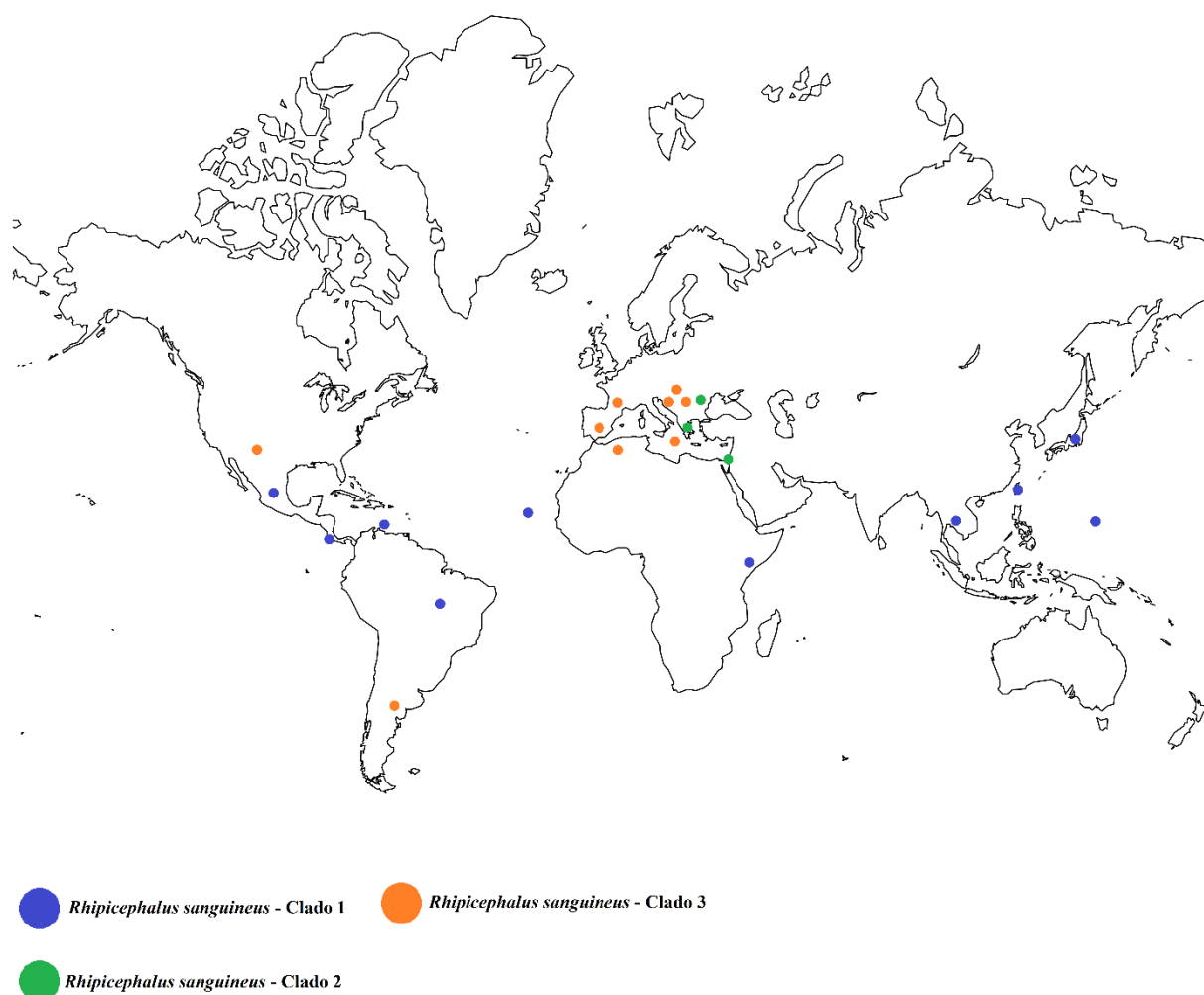


Figura 4.12: Distribuição geográfica das amostras pertencentes aos três clados de *R. sanguineus* obtidos através da análise filogenético do marcador 16S.

Na figura 4.13 estão os resultados de um estudo filogenético, obtidos pelo método estatístico *Maximum Likelihood*, para a determinação das relações filogenéticas entre as várias espécies do género *Rhipicephalus* usando várias sequências obtidas do Genbank do marcador 12S de várias espécies. As sequências obtidas das amostras CV3041 e CV3042 foram incluídas neste estudo.

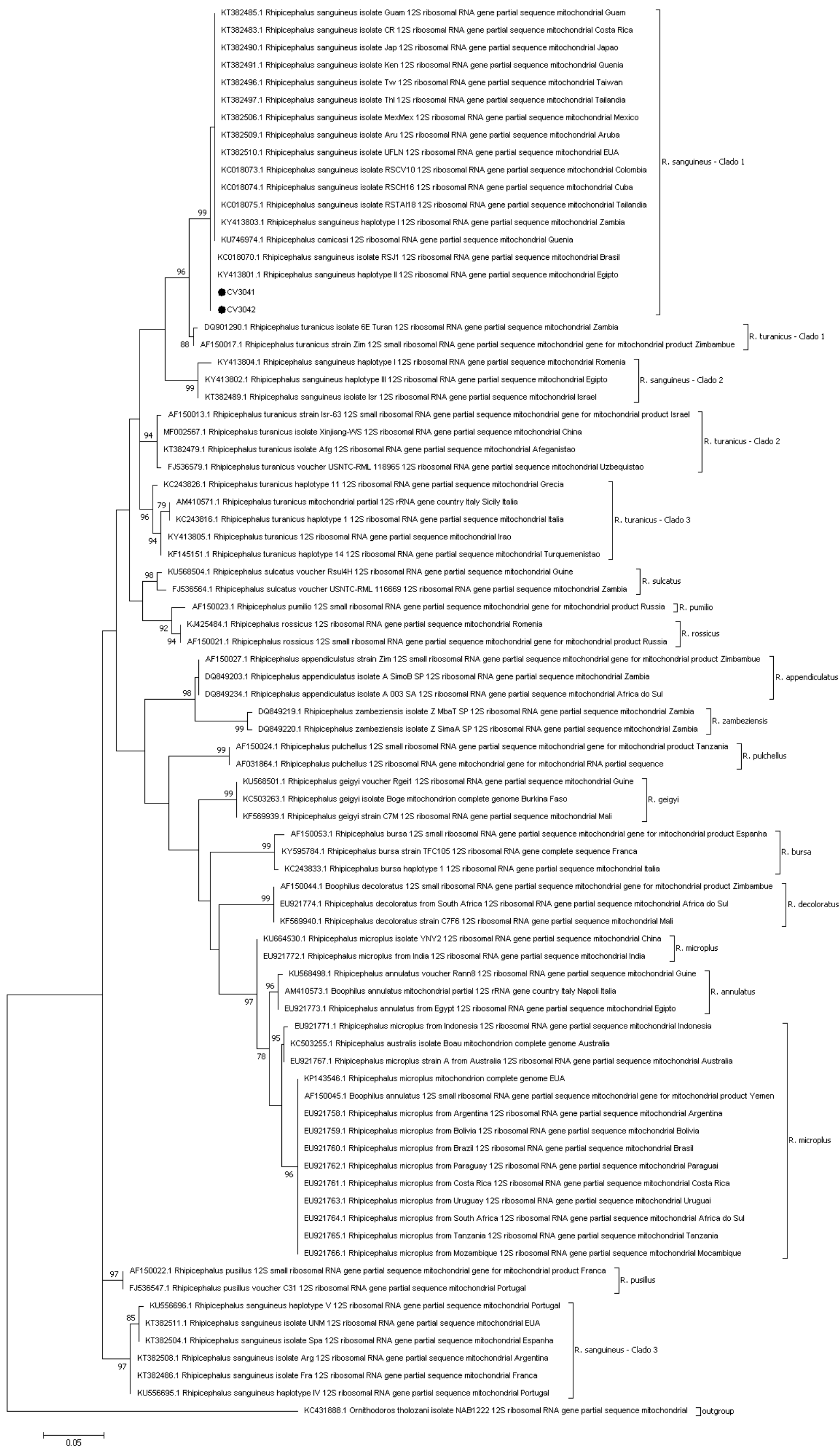


Figura 4.13: Filogenia do género *Rhipicephalus* obtida através do marcador 12S. Árvore filogenética inferida pelo método Maximum Likelihood baseado no modelo Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993). Os números representam a percentagem de árvores em que os taxa associados ficaram juntos depois de 1000 simulações (valores abaixo de 75% foram omitidos). As amostras marcadas com um círculo fechado foram obtidas neste trabalho.

Para perceber melhor a distribuição geográfica das diferentes espécies identificadas como *R. sanguineus* (de acordo com a figura 4.13) foi marcado no seguinte mapa (Figura 4.14) a localização da recolha de cada exemplar.

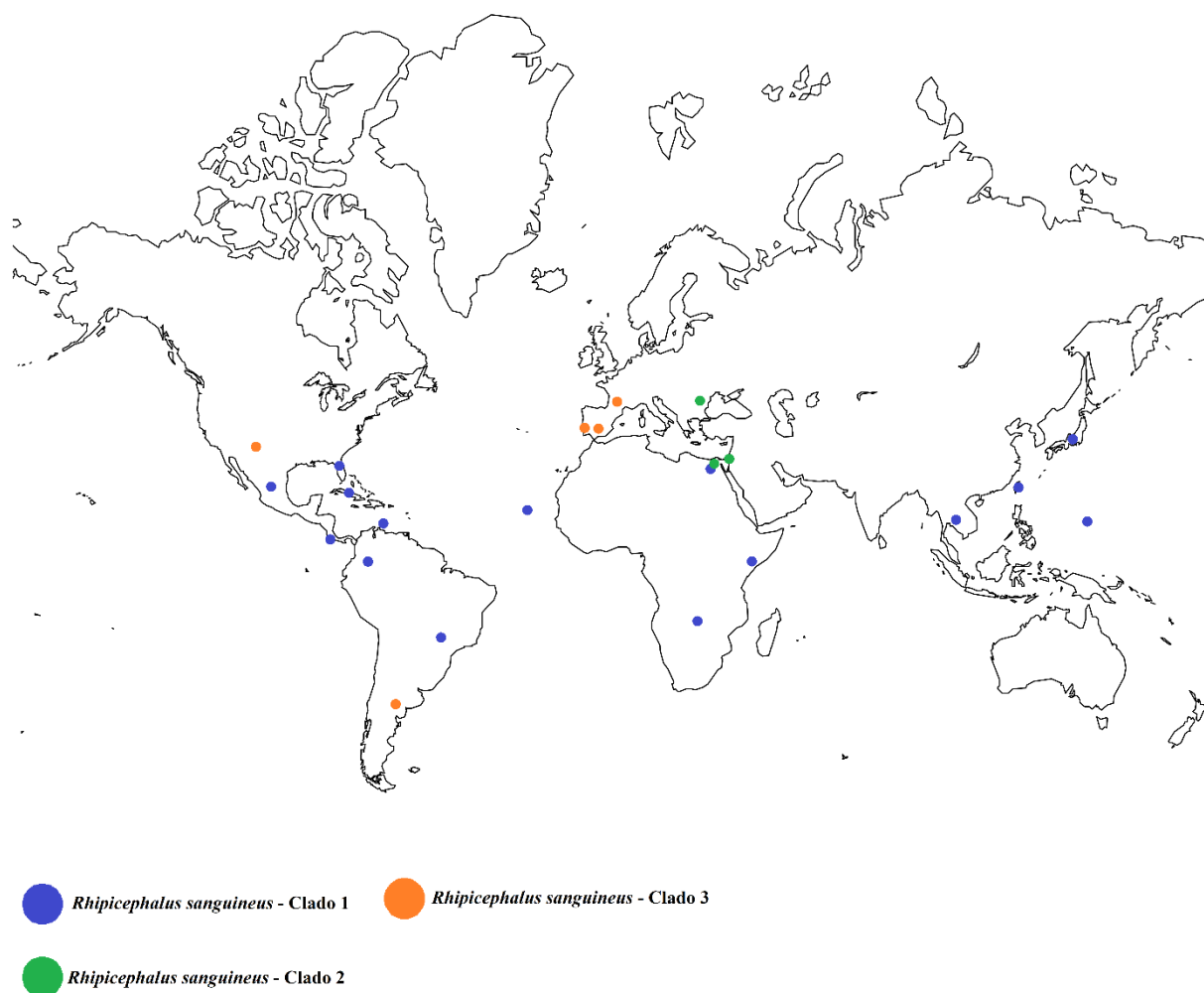


Figura 4.14: Distribuição geográfica das amostras pertencentes aos três clados de *R. sanguineus* obtidos através da análise filogenético do marcador 12S.

Para perceber melhor a distribuição geográfica das diferentes espécies identificadas como *Rhipicephalus turanicus* (Pomerantzev, 1940), de acordo, com a figura 4.13 marcado no seguinte mapa (Figura 4.15) a localização da recolha de cada exemplar.

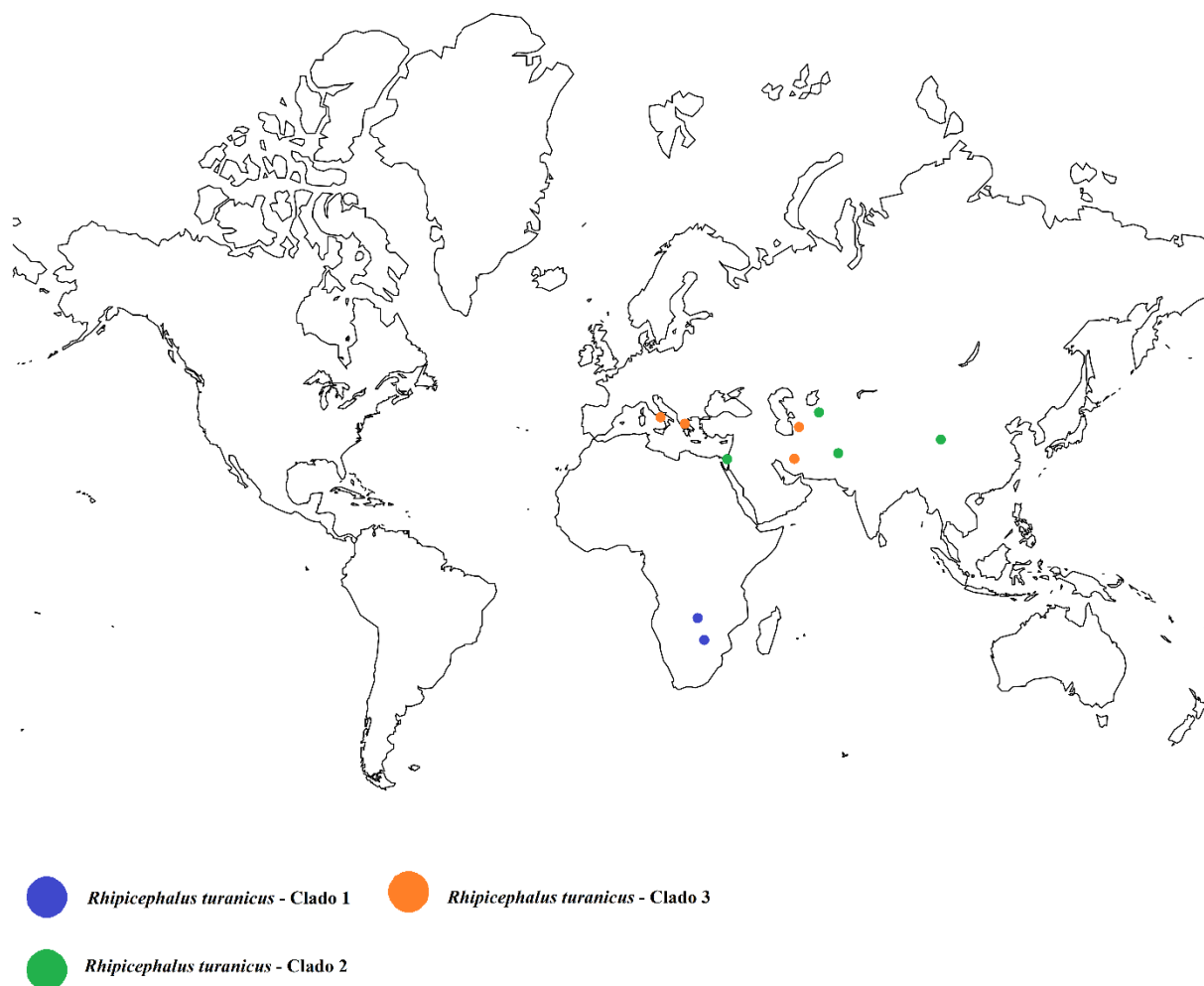


Figura 4.15: Distribuição geográfica das amostras pertencentes aos três clados de *R. turanicus* obtidos através da análise filogenético do marcador 12S.

## 5 Discussão

### 5.1 Pesquisa de agentes patogénicos

A identificação de agentes patogénicos com o marcador EC 16S\_F/EC 16S\_R em cinco carraças do género *Rhipicephalus* e em duas do género *Dermacentor* está de acordo com a bibliografia uma vez que este tipo de agentes patogénicos já tinha sido associado ao género *Rhipicephalus* em trabalhos como Cicuttin et al., 2015; Ramos et al., 2014; Yabsley et al., 2008. Também o género *Dermacentor* já foi previamente associado a estes agentes patogénicos em trabalhos como Javkhlan et al., 2014; Johnson et al., 1998; Kocan et al., 1992.

De igual modo para o par de primers PP18S\_F/PP18S\_R, os resultados obtidos também estão de acordo com a bibliografia pois o género *Rhipicephalus* já foi associado aos géneros *Babesia* e *Hepatozoon* (Aktas e Özübek, 2017; M'ghirbi e Bouattour, 2008) tal como o género *Ixodes* (Karlsson e Andersson, 2016; Welc-Falęciak et al., 2012) e *Dermacentor* (Schaarschmidt et al., 2013; Sumrandee et al., 2015).

### 5.2 Identificação da sequência obtida de agentes patogénicos

Os resultados obtidos com o par de primers EC 16S\_F/ EC 16S\_R apresentavam fragmentos de DNA com cerca de 500 pb o que sugere que, de facto, a região alvo do gene 16S de DNA ribossomal estava a ser amplificada. A presença ou ausência de uma banda de DNA no gel de agarose após electroforese era o suficiente para obter uma resposta quanto à ausência ou presença de agentes patogénicos, no entanto algumas amostras foram purificadas e sequenciadas para fazer a identificação do agente patogénico detectado.

Os resultados das primeiras sequências eram muito pouco esclarecedores, as cadeias *forward* e *reverse* obtidas não eram complementares e não era possível fazer a compilação da sequência num *contig*. Estes resultados sugerem que os primers podiam estar a fazer o *annealing* em DNA de organismos distintos, o que implicaria uma baixa especificidade dos primers. Usando uma temperatura de *annealing* progressivamente mais alta determinou-se a temperatura de *annealing* mais alta em que se obtinha resultados positivos. Deste modo obteve-se uma amostra que foi, posteriormente, purificada e enviada para sequenciação de onde se obtiveram duas cadeias complementares.

Numa primeira análise, foi feito um *Blastn* recorrendo ao site NCBI, os resultados foram organizados de acordo com a sua taxonomia como é possível verificar na figura 4.2. Estes resultados sugerem que a amostra pertença ao género *Sphingomonas* embora fosse esperado que os primers apenas fizessem *annealing* em DNA específico da família *Anaplasmataceae*. De modo a esclarecer a taxonomia da amostra obtida foram realizados dois testes filogenéticos, no primeiro teste foram usadas várias sequências pertencentes a diversos géneros da família *Anaplasmataceae*, a sequência SFAB17 M, e uma sequência pertencente à família *Sphingomonadaceae* como *outgroup*. Os resultados deste teste filogenético (Figura 4.3) sugerem que a amostra SFAB17 M fica inserida, com um suporte estatístico elevado, num grupo juntamente com a amostra pertencente ao *outgroup*, o que significa que esta amostra não pertence à família *Anaplasmataceae* e está geneticamente mais relacionada com a família *Sphingomonadaceae*.

Num segundo teste foram usadas várias sequências pertencentes a diversos géneros da família *Sphingomonadaceae*, a sequência SFAB17 M, e uma sequência pertencente a *E. canis* da família *Anaplasmataceae* como *outgroup*. Os resultados (Figura 4.4) sugerem que a amostra SFAB17 M pertence ao género *Sphingomonas*.

Os resultados observados nas figuras 4.3 e 4.4 sugerem que apesar de ser esperada uma especificidade dos primers usados para a família *Anaplasmataceae* e, portanto, que a amostra fosse pertencente a esta família, na verdade a amostra faz parte da família *Sphingomonadaceae* e género *Sphingomonas*.

Foi, ainda, feito um teste final para a identificação do agente patogénico. Para fazer a identificação foi feito um novo *Blastn*, direcionado à base de dados das sequências da subunidade 16S do DNA ribossomal e apenas para o taxa *Sphingomonadaceae*, de modo a evitar resultados não identificados. Foi, então, feito um teste usando todas as sequências do Genbank resultantes deste *Blastn* que apresentassem uma identidade superior a 95% com a amostra SFAB17 M. Os resultados deste teste (Figura 4.5) sugerem que a amostra SFAB17 M está inserida no grupo da espécie *Sphingomonas leidy* (Poindexter, 1964), embora apresente alguma distância genética comparativamente às sequências utilizadas pertencentes a esta espécie. Ainda assim e atendendo à problemática quanto ao conceito de espécie em microbiologia (Konstantinidis et al., 2006), não é possível afirmar com certeza que a amostra SFAB17 M pertence a esta espécie.

Após estes testes foi possível um maior esclarecimento quanto à identificação da amostra SFAB17 M porém é, ainda, necessário perceber como se chegou a este resultado inesperado. Os primers ECB / ECC renomeados neste trabalho como EC16S\_F / EC16S\_R são, de acordo com a bibliografia, específicos da família *Anaplasmataceae* (Cardoso et al., 2016), no entanto a experiência científica desenvolvida por este grupo apresenta diferenças que podem explicar este problema. Os autores recorriam a um primeiro passo que envolvia um screening inicial por qPCR para uma região do marcador 16S do DNA ribossomal específico dos géneros *Ehrlichia* e *Anaplasma*. Apenas as amostras positivas neste primeiro passo eram sujeitas, posteriormente, a um Nested PCR com os primers ECB / ECC numa primeira parte, e numa segunda parte com primers específicos das espécies *E. canis* ou *Anaplasma platys* (Dumler et al., 2001), este procedimento experimental assegura que uma amostra com ausência de DNA de um organismo pertencente aos géneros *Ehrlichia* ou *Anaplasma* não prossegue para o segundo passo do procedimento. Considerando, ainda, a possibilidade da existência de duas espécies bacterianas, uma pertencente à família *Sphingomonadaceae* e uma pertencente à família *Anaplasmataceae*, apenas o DNA da espécie pertencente à família *Anaplasmataceae* seria amplificado porque o segundo passo deste procedimento consiste num Nested PCR que na segunda fase usa primers específicos para apenas duas espécies. De acordo com isto é possível concluir que os resultados obtidos neste trabalho resultam de uma adaptação incompleta do procedimento experimental original e, na teoria, com uma adaptação apropriada do procedimento experimental original não seria possível obter estes resultados.

Um modo de confirmar a inespecificidade dos primers EC16S\_F / EC16S\_R é através de um *Blastn* dos próprios primers, este método no entanto é limitado porque devido à quantidade muito reduzida dos nucleótidos constituintes de cada primer é esperado que os resultados do *Blastn* sejam constituídos unicamente por sequências com uma identidade de 100%, no entanto não é necessário que um primer seja em toda a sua extensão complementar da sequência alvo de modo que embora os resultados obtidos sejam, em princípio, pertencentes a organismos cujo DNA seria amplificado por estes primers, certamente não correspondem à totalidade dos organismos nesta condição. O primer EC16S\_F (Figura 4.6) é bastante global, ou seja pouco específico para um grupo como a família *Anaplasmataceae*, é possível observar que até há sequências pertencentes a filos diferentes de bactérias na lista. No caso do primer EC16S\_R (Figura 4.7) apresenta uma especificidade mais limitada, com várias espécies pertencentes à família *Anaplasmataceae* nesta lista, no entanto há, também, amostras pertencentes a filos diferentes nesta lista. Tendo estes resultados em conta, a possibilidade dos primers não serem apropriados para a pesquisa de organismos exclusivamente da família *Anaplasmataceae* torna-se considerável, de modo que para a pesquisa de agentes patogénicos da família *Anaplasmataceae* usando estes primers seria necessário adoptar um procedimento experimental diferente, tal como descrito em Cardoso et al., 2016.

Os resultados anteriormente debatidos sugerem que a amostra SFAB17 M seja pertencente à espécie *S. leidy*, esta espécie foi recentemente re-descrita como pertencente ao género *Sphingomonas*

(anteriormente estava associada ao género *Caulobacter*) não é patogénica e as estirpes conhecidas foram isoladas a partir de água doce, do solo e do sistema digestivo de milípedes, nunca tendo sido isolada a partir de carraças (Chen et al., 2012). A presença de organismos do género *Sphingomonas* já foi associados a carraças (Tveten et al., 2013; van Treuren et al., 2015) incluindo carraças do género *Dermacentor* (Gurfield et al., 2017) o que sugere que este género faça parte da microbiota de carraças, embora não seja claro se estes organismos se encontram no sistema digestivo das carraças ou se estão localizadas nas superfícies das carraças como micro-colónias, como sugerido por Benson et al., 2004.

Para a detecção de protozoários dos géneros *Babesia* e *Hepatozoon* usou-se o par de primers Piroplasmid-F / Piroplasmid-R (Cardoso et al., 2016) renomeados neste trabalho como PP18S\_F / PP18S\_R, este par de primers gera fragmentos de DNA com cerca de 400 pb, os fragmentos obtidos neste trabalho estão em conformidade com o esperado. O objectivo desta experiência era a pesquisa de agentes patogénicos pertencentes ao género *Babesia* e *Hepatozoon* de modo que os resultados não foram sequenciados para posterior identificação dos agentes patogénicos.

É importante referir que, ao contrário do par de primers usado para detecção de bactérias da família *Anaplasmataceae*, este par de primers não depende de um screening inicial ou experiências posteriores, o procedimento experimental para este par de primers consiste num único PCR tal como observado em Cardoso et al., 2016 e em Tabar et al., 2008 onde este par de primers foi usado pela primeira vez.

### **5.3 Eficácia de amplificação dos marcadores usados para caracterização molecular:**

Quinze das amostras testadas (CV3039, CV3040, MOC3038, MOC3043, MOC3044, MOC3056, A3077, A3078, A3087, A3088, CV3093, CV3094, CV3095, A3102 e A3103) apesar de apresentarem valores indicativos da presença de DNA em quantidade suficiente (Anexos – Tabela 8.1) não apresentaram amplificação para nenhum dos marcadores testados. É incerta a razão pela qual estas amostras não apresentaram amplificação, algumas das possíveis explicações para isto são a baixa sensibilidade dos métodos de quantificação de DNA por absorvância de UVs associados à sua incapacidade para avaliar a qualidade do DNA. Quando as amostras não estão puras e apresentam valores de A260/A280 e A260/A230 abaixo de valores entre 1.8 e 2.0 pode haver presença de outros componentes que interfiram na leitura da absorvância como por exemplo o fenol (Glasel, 1995). As amostras que não amplificaram com nenhum dos marcadores têm valores de A260/A230 muito abaixo dos 1.8, o que pode indicar uma contaminação por fenóis das amostras e explicar a não amplificação das mesmas. É também possível que o DNA apresente algum nível de degradação uma vez que este tipo de método de avaliação de concentração de DNA não faz discriminação entre dsDNA, ssDNA ou até mesmo nucleótidos livres (Sedlackova et al., 2013), de modo que há a possibilidade de apesar dos valores obtidos no NanoDrop indicarem presença de quantidades suficientes de DNA, não há garantia que estes valores correspondam a dsDNA.

Outra possibilidade seria o uso de ddH<sub>2</sub>O para ressuspender o DNA ter permitido uma alteração imprevisível do pH que teria levado à degradação do DNA, uma vez que ddH<sub>2</sub>O não tem a capacidade de funcionar como um tampão e conservar o pH da amostra. A presença de substâncias inibidoras de PCR também pode interferir com o PCR e causar resultados que podem variar entre uma menor taxa de sucesso na amplificação do DNA e uma inibição completa do processo. Mesmo quantidades baixas de proteínas ou fenol podem, também, funcionar como substâncias inibitórias do PCR (Rossen et al., 1992; Schrader et al., 2012).



Há, ainda, a possibilidade de haver uma incompatibilidade dos primers com estas amostras. É particularmente difícil excluir esta hipótese com um grau de certeza elevado, no entanto as amostras CV3040, CV3041 e CV3042, foram colectadas no mesmo hospedeiro e há a possibilidade que pertençam à mesma espécie, ainda assim as amostras CV3041 e CV3042 foram processadas e apresentaram amplificação para os marcadores 16S e 12S, e a amostra CV3040 não apresentou amplificação para ambos os marcadores o que sugere que o factor responsável pela falta de resultados desta amostra, neste caso, não seja a incompatibilidade dos primers com este tipo de espécie. Outro factor que sugere que a incompatibilidade de primers não foi a causa deste problema é o facto da região da sub-unidade 12S do DNA ribossomal ser DNA não codificante e apresentar regiões altamente conservadas alternadas com regiões altamente variáveis (Beati e Keirans, 2001), o primer para este marcador foi criado apartir do alinhamento entre as regiões mais conservadas de vários grupos divergentes de artrópodes, estas regiões conservadas correspondem às hélices da estrutura secundária da sub-unidade do DNA ribossomal 12S de modo que mutações nestas regiões poderia inviabilizar o funcionamento do ribossoma, e portanto, não é expectável que haja variação genética dentro de um género suficientemente alta para que algumas espécies sejam incompatíveis com estes primers. Esta propriedade permite que o marcador 12S possa até ser usado como um método de validação da extracção do DNA como se pode verificar em alguns trabalhos recentes com o objectivo de detectar agentes patogénicos por métodos de PCR como por exemplo Santos-Silva et al., 2017.

Uma outra possível causa deste problema está relacionado com a idade das amostras, ou seja, o ano da sua recolha e o seu método de conservação. Foi usado formol no meio de conservação de algumas amostras (Tabela 3.1), o formol é um solvente orgânico que está ligado à degradação do DNA (Grafstrom et al., 1983; Tokuda et al., 1990) e a sua presença explicaria o facto de amostras conservadas num meio com formol não apresentarem resultados positivos para nenhum dos marcadores como é o caso das amostras MOC3038, MOC3043, MOC3044 e MOC3056. O uso de etanol em amostras mais antigas também já foi associado a uma maior taxa de insucesso (Beati e Keirans, 2001), o que também poderia explicar este problema visto que o modo de conservação de todas as amostras envolve etanol e algumas amostras (Tabela 3.1) são relativamente antigas, o que pode explicar a não amplificação das amostras CV3039, CV3040, MOC3038, MOC3043, MOC3044, MOC3056, CV3093, CV3094 e CV3095 cuja idade varia entre 23 e 60 anos.

É, também, impossível excluir a possibilidade de erro humano em algum passo da extracção de DNA ou da técnica de PCR e, portanto, esta possibilidade também deve ser considerada.

Considerando que houve algum problema nas 15 amostras previamente referidas e que a não amplificação não se deveu a problemas relacionados aos primers então a eficácia de amplificação dos vários primers apresentaria valores relativamente mais altos e no caso dos primers dos marcadores 16S e 12S teríamos uma taxa de sucesso de amplificação perto dos 100%, valores que estariam de acordo com a bibliografia (Lv et al., 2014).

A taxa de sucesso do COI apresenta valores relativamente baixos (Tabela 4.2 e figura 4.8), sendo o COI o marcador de excelência para o *DNA Barcoding* (Lv et al., 2013) é necessário atingir um nível de eficácia superior para que seja possível a identificação específica de carraças sem que hajam problemas. Esta baixa taxa de sucesso poderá estar relacionada com a especificidade dos primers.

Foram usados dois pares de primers para a amplificação do marcador COI, o par de primers o par de primers LCO1490\_F / HCO2198\_R e o par de primers Cox1F / Cox1R. O par de primers LCO1490\_F / HCO2198\_R foi desenvolvido para amplificar a região COI de vários organismos invertebrados, no artigo onde foram descritos é possível perceber que foram usadas sequências de vários organismos de variados grupos desde ouriços do mar até humanos, de modo que estes primers são considerados

universais (Folmer et al., 1994), o que implica baixa especificidade para grupos em particular, no caso das carraças, trabalhos que avaliaram a adequabilidade de vários primers para carraças como Lv et al., 2014 já tinham previamente descrito estes primers como tendo uma baixa taxa de sucesso nas carraças, o que é compreensível considerando o objectivo inicial destes primers.

O par de primers Cox1F / Cox1R foi desenvolvido mais recentemente num estudo de carraças de corpo duro por Chitimia et al., 2010, no entanto este estudo focava-se mais nos géneros *Dermacentor* e *Haemaphysalis*, em 2014 a eficácia deste par de primers foi avaliada em Lv et al., 2014, e os resultados foram muito positivos, no entanto o género *Rhipicephalus* teve uma representação muito baixa neste estudo, foram usadas apenas duas espécies, *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) e *R. sanguineus*, embora todos os exemplares de *R. microplus* tenham apresentado amplificação com este par de primers, não foi possível amplificar o exemplar de *R. sanguineus*. Devido à baixa representação do género *Rhipicephalus* nestes estudos não é possível dizer que seria expectável observar uma alta ou baixa taxa de sucesso na amplificação do marcador COI, no entanto os resultados obtidos ao longo deste trabalho sugerem que a taxa de sucesso esteja perto dos 60%, embora a quantidade de amostras usadas tenha sido muito reduzida e, portanto, seja impossível tirar conclusões sólidas quanto à taxa de sucesso de amplificação do marcador COI usando este par de primers.

Neste trabalho usou-se primeiro o par de primers LCO1490\_F / HCO2198\_R e em caso de resultado negativo, recorreu-se ao par de primers Cox1F / Cox1R, de modo que os resultados apresentados referem-se à taxa de sucesso na amplificação do marcador COI recorrendo a estes dois pares de primers sequencialmente e não à taxa de sucesso individual de cada um dos pares de primers, uma vez que o par de primers Cox1F / Cox1R só era usado após a obtenção de um resultado negativo com o par de primers LCO1490\_F / HCO2198R, é também possível que numa amostra em que haja um resultado negativo, apenas um dos primers seja inespecífico e o restante seja específico o suficiente para permitir um annealing, tendo em conta esta possibilidade uma maneira de aumentar a taxa de sucesso da amplificação deste marcador seria uma combinação de primer forward de um dos pares de primers, com o primer reverse do restante, sem dispensar uma análise bioinformática prévia para descartar a possibilidade de os primers reagirem entre si e formarem dímeros.

#### 5.4 Filogenia do género *Rhipicephalus*

Nota-se uma presença de clados bem definidos correspondentes às várias espécies do género *Rhipicephalus* na análise filogenética com o marcador COI (Figura 4.9), todos estes clados apresentam um suporte estatístico elevado. No entanto não há um clado bem definido para *R. sanguineus*, é observável a distribuição das amostras identificadas como pertencentes a *R. sanguineus* em quatro clados distintos e ambos com um suporte estatístico elevado. A figura 4.10 apresenta os países onde estas amostras foram colectadas de modo a permitir uma melhor visualização da distribuição geográfica de cada clado.

Na figura 4.10 observou-se a separação dos quatro clados em dois grupos, *R. sanguineus* – Clado 4 apresenta uma distribuição predominante em zonas tropicais e sub-tropicais, apesar de alguns espécimes terem sido colhidos em zonas com um clima mais temperado, como é o caso das amostras colhidas no Canadá e E.U.A., no entanto a existência de carraças deste grupo nestas zonas pode ser explicada pela ausência de uma barreira física ou isolamento geográfico nos E.U.A. e portanto é possível que hospedeiros destes grupos transitem entre a zona sub-tropical e temperada dos E.U.A. ou mesmo Canadá. Isto implicaria. Ainda, que carraças deste clado consigam desenvolver-se numa região temperada, facto que poderá ser explicado por uma ligeira adaptação das carraças a estes ambientes ou por uma ligeira alteração na temperatura destas regiões.

Os restantes três clados estão distribuídos ao longo de regiões temperadas. Estes resultados estão de acordo com Moraes-Filho et al., 2011; Sanches et al., 2016; Szabó et al., 2005; Zemtsova et al., 2016. A existência de vários clados distribuídos na região temperada foi detectada e abordada por Dantas-Torres et al., 2013 num trabalho em que foram descritos três outros clados, com espécimes oriundos da região de Itália e Grécia, da Nigéria, e da Índia e Paquistão. A distribuição geográfica de *R. sanguineus* – Clado 1 observada na figura 4.10, sugere que este clado corresponda à Linhagem Temperada, a distribuição geográfica do Clado 4 sugere que esta pertença à Linhagem Tropical. O Clado 2, pela sua distribuição ao longo de Grécia e Itália, é possível que corresponda a *R. sp. I* descrito por Dantas-Torres et al., 2013. O Clado 3 demonstra ter uma distribuição apenas ao longo da região dos Balcãs, esta é uma zona com características geográficas que podem ter causado um isolamento geográfico e reprodutor de um ancestral desta espécie, o que levou a um processo de especiação que resultou na limitada distribuição geográfica dos espécimes deste clado. De notar que alguns exemplares nesta lista estão identificados como *Rhipicephalus leporis* (Pomerantzev, 1946), no entanto após análise filogenética ficaram inseridos neste grupo, o que sugere que *R. leporis* apresenta caracteres morfológicos diagnosticantes muito semelhantes a *R. sanguineus* o que pode resultar em identificações menos correctas. Isto reforça a importância da complementação da análise morfológica com uma análise molecular.

Os clados de *Rhipicephalus rossicus* (Yakimov & Kol-Yakimova, 1911) e *Rhipicephalus pumilio* (Schulze, 1935) estão definidos, no entanto não há um suporte estatístico elevado o suficiente para confirmar a distinção destas duas espécies. É, no entanto, sugerido pelos resultados que estas duas espécies tenham um ancestral comum do qual divergiram recentemente, provavelmente através de isolamento geográfico.

*Rhipicephalus turanicus* aparenta estar dividido em dois clados, *R. turanicus* – Clado 1 engloba amostras em vários locais da Europa e um exemplar da África do Sul num grupo em que é possível observar alguma diversidade intraespecífica. O *R. turanicus* – Clado 2 é constituído por exemplares colhidos no continente Asiático, na China e no Iraque, é possível que o isolamento geográfico tenha resultado numa divergência de um ancestral comum de *R. turanicus* em dois grupos distintos encontrados no continente Asiático e no continente Europeu.

Os clados correspondentes às espécies *Rhipicephalus guilhoni* (Morel & Vassiliades, 1963), *Rhipicephalus pusillus* (Collado, 1936), *Rhipicephalus haemaphysaloides* (Supino, 1897), *Rhipicephalus muhsamae* (Morel & Vassiliades, 1965), *Rhipicephalus appendiculatus* (Neumann, 1901) e *Rhipicephalus bursa* (Canestrini & Fanzago, 1878) estão bem definidos e com um elevado suporte estatístico. De notar que a distribuição geográfica de *R. guilhoni* parece estar de acordo com a espécie descrita como *R. sp. IV* por Dantas-Torres et al., 2013 o que sugere que este morfotipo corresponda a *R. guilhoni*.

Na parte inferior da árvore filogenética (Figura 4.9) está representado o grupo *R. microplus* (De Clercq et al., 2015) constituído pelas espécies *Rhipicephalus annulatus* (Say, 1821), *Rhipicephalus decoloratus* (Koch, 1844), *Rhipicephalus geigy* (Aeschlimann & Morel, 1965) e *R. microplus*. As espécies estão bem definidas e com elevado suporte estatístico, no entanto vários exemplares do continente Asiático identificados como *R. microplus* e *R. decoloratus* são pertencentes ao mesmo clado, isto é explicável pela semelhança destas duas espécies e pela consequente dificuldade para a sua identificação morfológica, provavelmente estes exemplares pertencem todos à mesma espécie embora seja impossível ter a certeza se são *R. microplus* ou *R. decoloratus*.

Na figura 4.11 é possível observar as relações filogenéticas do género *Rhipicephalus* com base em sequências do marcador 16S. É importante levar em conta o facto que os espécimes que deram origem

às sequências usadas na filogenia com o marcador COI não são os mesmos que deram origem às sequências usadas na filogenia com o marcador 16S. De modo que na ausência de sequências de um determinado marcador de uma determinada espécie vai originar uma ausência dessa espécie nos resultados obtidos com esse marcador. No entanto se houver sequências dessa espécie com um marcador distinto então essa espécie fará parte dos resultados. Tendo isto em conta é esperado que os resultados obtidos dos diversos marcadores estejam de acordo, no entanto isto não implica que sejam integralmente iguais.

À semelhança do marcador COI, não foi possível definir apenas um clado para *R. sanguineus*, foram formados três cladogramas distintos e com suporte estatístico alto. Na figura 4.12 é possível observar a distribuição geográfica dos exemplares analisados e, tal como foi visto nos resultados obtidos com o marcador COI, é possível distinguir um clado com uma distribuição geográfica tropical e sub-tropical correspondente à Linhagem Tropical de *R. sanguineus* (Dantas-Torres et al., 2013), identificado na figura 4.12 como *R. sanguineus* – Clado 1, e outros dois cladogramas nas zonas temperadas identificados como *R. sanguineus* – Clado 2 e *R. sanguineus* – Clado 3, ao contrário do observado na figura 4.10 não há um quarto clado, isto pode ser explicado pela ausência de sequências pertencentes a este clado ou pode indicar que a existência de um quarto grupo na figura 4.12 seja o resultado da existência de duas populações diferentes da mesma espécie com variação genética intra-específica na região do marcador COI elevada o suficiente para a sua distinção num clado separado, mas sem tal variação genética intra-específica na região do marcador 16S.

Duas das sequências obtidas neste trabalho CV3041 e CV3042 foram agrupadas no clado correspondente à Linhagem Tropical de *R. sanguineus*, aqui identificada como *R. sanguineus* – Clado 1 (Dantas-Torres et al., 2013). Estes resultados são esperados dado que Cabo Verde está localizado numa região tropical.

No clado 1 de *R. sanguineus* é, ainda, possível notar a existência de duas sequências originalmente identificadas como *Rhipicephalus camicasi* (Morel, Mouchet & Rodhain, 1976). Estes resultados sugerem que esses exemplares pertencessem ao grupo de *R. sanguineus* da Linhagem Tropical. É possível que a incompatibilidade entre a identificação morfológica e a identificação molecular seja resultante de uma semelhança morfológica entre estas duas espécies.

O clado de *R. guilhoni* está bem definido e com suporte estatístico elevado. Estes resultados estão em conformidade com os resultados obtidos com o marcador COI, e esta análise com o marcador 16S reforça a hipótese deste clado corresponder ao morfotipo *R. sp IV* descrito por Dantas-Torres et al., 2013.

*R. turanicus* ficou, ao contrário do observado nas figuras 4.9 e 4.10, agrupado em um único clado, esta alteração é explicada pela ausência de exemplares de *R. turanicus* oriundos do continente Asiático, uma vez que estes exemplares constituíam o segundo clado de *R. turanicus* nos resultados observados nas figuras 4.9 e 4.10.

Os cladogramas representantes das espécies *R. haemaphysaloides*, *Rhipicephalus simus* (Koch, 1844), *R. muhsamae*, *R. rossicus*, *Rhipicephalus maculatus* (Neumann, 1901), *R. bursa* e *R. geigy* estão bem definidos e suportados por um elevado suporte estatístico.

Na parte inferior das figuras 4.11 e 4.12 está o grupo de *R. microplus*, é possível observar vários grupos bem definidos neste clado. Um primeiro grupo é composto por exemplares oriundos da Indonésia, Austrália e Nova Caledónia, é possível que o isolamento geográfico das carraças nesta região tenha resultado numa pequena divergência dos *R. microplus* desta zona em relação aos restantes. Estes resultados sugerem, ainda, que o exemplar identificado como *Rhipicephalus australis* (Fuller, 1899) pertença à espécie *R. microplus* encontrada neste continente.

Há, ainda, um grupo com os *R. microplus* oriundos da Índia e da China, neste grupo é possível observar que há um exemplar identificado como *R. sanguineus* que foi identificado molecularmente como *R. microplus*, provavelmente isto é resultado de um lapso na identificação do exemplar. Finalmente há um último grupo definido que é constituído por exemplares do continente Americano e Africano o que sugere a presença da mesma espécie nestes dois continentes.

Os resultados da análise filogenética com o marcador 12S podem ser consultados na figura 4.13. À semelhança do sucedido na análise filogenética com o marcador 16S foram obtidos três clados para a espécie *R. sanguineus*. O clado identificado como *R. sanguineus* – Clado 1 é constituído por exemplares oriundos de Países situados nas zonas tropicais, à semelhança do que foi observado com o marcador 16S. Duas das sequências obtidas neste trabalho CV3041 e CV3042 estão inseridas neste clado (Figuras 4.13 e 4.14), este resultado está em conformidade com o que foi observado com os resultados do marcador 16S. Há, à semelhança dos resultados com o marcador 16S (Figura 4.11), a presença de duas sequências identificadas como *R. camicasi* neste clado, estes resultados conferem robustez à possibilidade destes dois exemplares terem sido mal identificados morfológicamente devido à sua semelhança com *R. sanguineus*.

Os clados correspondentes a *R. sanguineus* – Clado 2 e *R. sanguineus* - Clado 3 são constituídos por exemplares recolhidos em Países de zonas temperadas, comparando as imagens 12 e 14 é possível notar que há duas espécies presentes no continente Europeu, uma correspondente à Linhagem Temperada de *R. sanguineus* (*R. sanguineus* - Clado 3) e outra com uma distribuição no Leste da Europa e Egipto (*R. sanguineus* - Clado 2), tal como foi observado na figura 4.12 com os resultados do marcador 16S. Na figura 4.10 obtida com os resultados do marcador COI há três espécies europeias, sendo que duas delas ocupam a zona ocidental Europeia. Há a possibilidade desta discrepância em relação aos resultados obtidos com os marcadores 16S e 12S se dever à existência de duas populações semelhantes pertencentes à mesma espécie, cuja divergência genética intraespecífica é alta o suficiente no marcador COI para que sejam separadas em dois clados numa análise a este marcador, mas com uma divergência genética intraespecífica insuficiente nos marcadores 16S e 12S para que possam ser inseridas em dois clados distintos. Na figura 4.9 embora os Clados 1 e 2 de *R. sanguineus* estejam separados é observável que há um ancestral comum a estes dois clados e que os mesmos têm uma divergência genética muito baixa, o que em conjunção com os resultados obtidos da análise filogenética com os marcadores 16S e 12S pode significar que se tratam da mesma espécie.

Na figura 4.14 é, também, observável a presença de duas espécies de *R. sanguineus* no Egipto, sendo que estas pertencem ao grupo de *R. sanguineus* observado nas zonas tropicais e temperadas. O Egipto tem um clima desértico que é caracterizado, entre outras características, pela sua grande amplitude térmica, de modo que há a possibilidade destas características particulares permitirem a que ambas as espécies de *R. sanguineus* consigam desenvolver-se nestas condições.

As análises filogenéticas dos marcadores COI (Figura 4.9) e 16S (Figura 4.11) apresentavam, respectivamente, dois e um clados para *R. turanicus*. No caso do marcador COI estes clados consistiam em exemplares colhidos no continente Europeu e Asiático, e no caso do marcador 16S em exemplares colhidos no continente Europeu. Na figura 4.13 é possível observar a existência de três clados para a espécie *R. turanicus*. Na figura 4.14 está representada a distribuição geográfica dos exemplares destes três clados de *R. turanicus*, Devido ao reduzido número de amostras não é possível tirar conclusões muito robustas, de notar que esta é uma espécie cuja taxonomia ainda não está muito esclarecida.

Os clados de *R. rossicus* e *R. pumilio* estão definidos, no entanto não há um suporte estatístico elevado o suficiente para confirmar a distinção destas duas espécies, o que está de acordo com o observado nos resultados com os marcadores COI e 16S.

Estão, também, definidos clados com elevado suporte estatístico para as espécies *Rhipicephalus sulcatus* (Neumann, 1908), *R. appendiculatus*, *Rhipicephalus zambeziensis* (Walker, Norval & Corwin, 1981), *Rhipicephalus pulchellus* (Gerstäcker, 1873), *R. geigy*, *R. bursa*, *R. decoloratus*, *R. annulatus* e *R. pusillus*.

Na parte inferior da figura 4.13 está o grupo de *R. microplus*, tal como discutido anteriormente é possível observar vários grupos bem definidos neste clado de acordo com a sua distribuição geográfica. Os resultados obtidos pela análise do marcador 12S estão em total acordo com os resultados obtidos pela análise do marcador 16S.

## 6 Conclusões

Foi possível detectar agentes patogénicos pertencentes aos géneros *Babesia* e *Hepatozoon*, no caso dos agentes patogénicos da família *Anaplasmataceae* não foi possível chegar a conclusões concretas uma vez que o par de primers é suposto ser usado num procedimento com vários passos, ao usar-se apenas este par de primers não é possível chegar a resultados conclusivos em relação a que tipo de DNA está a ser amplificado, no entanto foi obtida uma sequência que após análise foi identificada como *S. leidy*, esta é uma bactéria não patogénica que ainda só tinha sido isolada a partir de água doce, solo e sistema digestivo de milípede, no entanto este género de bactérias já foi associado ao microbioma de carraças como discutido previamente.

Não foi possível obter amplificação com os vários marcadores em algumas amostras como discutido previamente e há uma possibilidade de o DNA ter sofrido uma alteração que impossibilitou o processo de PCR de ser concluído com sucesso. Não é, no entanto, possível determinar a causa deste problema com certeza. Há, porém, possibilidades de otimizar o processo para eliminar algumas das possíveis causas como por exemplo a ressuspensão do DNA num tampão adequado em vez de ddH<sub>2</sub>O, a determinação da concentração de DNA usando um modo específico para dsDNA ou a adição de um passo de remoção de fenol no fim do protocolo de extração do DNA de modo a obter amostras mais puras.

Os marcadores 16S e 12S apresentaram uma elevada eficácia na amplificação das amostras, no entanto o marcador COI apresentou uma eficácia relativamente baixa, os primers usados foram usados pela primeira vez em estudos cujo foco não era o género *Rhipicephalus*, de modo que provavelmente há uma baixa especificidade dos primers usados para com este género. Há, portanto, uma necessidade da criação de primers específicos para as carraças deste género, foi observado que apesar da divergência genética inter-específica do género *Rhipicephalus* a maior parte das mutações são silenciosas de modo que seria fácil criar um par de primers específico para o marcador COI do género *Rhipicephalus*.

Após uma análise filogenética dos três diferentes marcadores usados na caracterização molecular das carraças (COI, 16S e 12S) foi possível observar que os resultados estavam de acordo na definição dos diversos clados. A única diferença encontrada foi a distribuição da espécie *R. sanguineus s.l.* em quatro clados nos resultados obtidos com o marcador COI, e em três clados nos resultados obtidos com os marcadores 16S e 12S. As sequências usadas em cada análise não são oriundas dos mesmos exemplares de modo que é impossível determinar se a existência de três clados nos resultados obtidos com os marcadores 16S e 12S se deve à falta de sequências de exemplares pertencentes ao quarto clado ou se nos resultados obtidos com o marcador COI há a formação de dois clados que apesar de alguma divergência genética, pertencem à mesma espécie. Uma maneira de esclarecer esta questão seria a realização de um estudo com vários exemplares recolhidos ao longo do continente Europeu, de modo que fosse possível obter as sequências dos três marcadores de cada exemplar e, depois, fazer uma nova análise filogenética para confirmar a existência ou não deste clado extra que foi obtido nos resultados com o marcador COI.

Há uma problemática na taxonomia da espécie *R. sanguineus s.s.* que resulta na formação do grupo *R. sanguineus s.l.* que precisa ser resolvida, para tal resolução seria necessário identificar qual destes clados corresponde, na realidade, à espécie *R. sanguineus s.s.* descrito por Latreille na França. De acordo com os resultados aqui obtidos apenas um destes clados ocorre na França de modo que é possível que Latreille tenha identificado um exemplar deste clado como *R. sanguineus s.s.*.

## 7 Bibliografia

- Aktas, M., Özübek, S., 2017. Transstadial Transmission of *Hepatozoon canis* by *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in field conditions. *J. Med. Entomol.* 54, 1044–1048. doi:10.1093/jme/tjx050
- Almeida, C., Simões, R., Coimbra-Dores, M.J., Rosa, F., Dias, D., 2017. Mitochondrial DNA analysis of *Rhipicephalus sanguineus* s.l. from the western Iberian peninsula. *Med. Vet. Entomol.* 31, 167–177. doi:10.1111/mve.12222
- Anderson, J.F., Magnarelli, L.A., 2008. Biology of Ticks. *Infect. Dis. Clin. North Am.* doi:10.1016/j.idc.2007.12.006
- Beati, L., Keirans, J.E., 2001. Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. *J. Parasitol.* 87, 32–48. doi:10.1645/0022-3395(2001)087[0032:AOTSRA]2.0.CO;2
- Benson, M.J., Gawronski, J.D., Eveleigh, D.E., Benson, D.R., 2004. Intracellular Symbionts and Other Bacteria Associated with Deer Ticks (*Ixodes scapularis*) from Nantucket and Wellfleet, Cape Cod, Massachusetts. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 616–620. doi:10.1128/AEM.70.1.616-620.2004
- Black, W.C., Piesman, J., 1994. Phylogeny of hard- and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 10034–8. doi:10.1073/pnas.91.21.10034
- Cardoso, L., Oliveira, A.C., Granada, S., Nachum-Biala, Y., Gilad, M., Lopes, A.P., Sousa, S.R., Vilhena, H., Baneth, G., 2016. Molecular investigation of tick-borne pathogens in dogs from Luanda, Angola. *Parasit. Vectors* 9, 252. doi:10.1186/s13071-016-1536-z
- Chen, H., Jogler, M., Rohde, M., Klenk, H.P., Busse, H.J., Tindall, B.J., Spröer, C., Overmann, J., 2012. Reclassification and emended description of *Caulobacter leidy* as *Sphingomonas leidy* comb. nov., and emendation of the genus *Sphingomonas*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 2835–2843. doi:10.1099/ijs.0.039636-0
- Chitimia, L., Lin, R.Q., Cosoroaba, I., Wu, X.Y., Song, H.Q., Yuan, Z.G., Zhu, X.Q., 2010. Genetic characterization of ticks from southwestern Romania by sequences of mitochondrial *cox1* and *nad5* genes. *Exp. Appl. Acarol.* 52, 305–311. doi:10.1007/s10493-010-9365-9
- Cicuttin, G.L., Tarragona, E.L., De Salvo, M.N., Mangold, A.J., Nava, S., 2015. Infection with *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in two lineages of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) from Argentina. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 6, 724–729. doi:10.1016/j.ttbdis.2015.06.006
- Coimbra-Dores, M.J., Nunes, T., Dias, D., Rosa, F., 2016. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) species complex: morphometric and ultrastructural analyses. *Exp. Appl. Acarol.* 70, 455–468. doi:10.1007/s10493-016-0095-5
- Coimbra-Dores, M.J., Rosa, F., Dias, D., Maia-Silva, M., Marques, W., Oliveira, A.C., 2017. Phylogenetic Insights on Mediterranean and Afrotropical *Rhipicephalus* genus (Acari: Ixodida) based on Mitochondrial DNA Data. *Ticks Tick. Borne. Dis.* (In Press)
- Dantas-Torres, F., 2010. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasit. Vectors* 3, 26. doi:10.1186/1756-3305-3-26
- Dantas-Torres, F., Latrofa, M.S., Annoscia, G., Giannelli, A., Parisi, A., Otranto, D., 2013. Morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato from the New and Old Worlds. *Parasit. Vectors* 6, 213. doi:10.1186/1756-3305-6-213



- De Clercq, E.M., Leta, S., Estrada-Peña, A., Madder, M., Adehan, S., Vanwambeke, S.O., 2015. Species distribution modelling for *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in Benin, West Africa: Comparing datasets and modelling algorithms. *Prev. Vet. Med.* 118, 8–21. doi:10.1016/j.prevetmed.2014.10.015
- Folmer, O., BLACK, M., HOEH, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3, 294–299. doi:10.1371/journal.pone.0013102
- Glasel, J.A., 1995. Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *Biotechniques* 18, 62–63.
- Grafstrom, R.C., Fornace, A.J., Autrup, H., Lechner, J.F., Harris, C.C., 1983. Formaldehyde damage to DNA and inhibition of DNA repair in human bronchial cells. *Science* 220, 216–218.
- Gurfield, N., Grewal, S., Cua, L.S., Torres, P.J., Kelley, S.T., 2017. Endosymbiont interference and microbial diversity of the Pacific coast tick, *Dermacentor occidentalis*, in San Diego County, California. *PeerJ*. doi:10.7717/peerj.3202
- Hall, T., 2011. BioEdit: An important software for molecular biology. *GERF Bull. Biosci.* 2, 60–61. doi:10.1002/prot.24632
- Javkhlan, G., Enkhtaivan, B., Baigal, B., Myagmarsuren, P., Battur, B., Battsetseg, B., 2014. Natural *Anaplasma phagocytophilum* infection in ticks from a forest area of Selenge province, Mongolia. *West. Pac Surveill Response J* 5, 21–24. doi:10.5365/WPSAR.2013.4.3.001
- Johnson, E.M., Ewing, S.A., Barker, R.W., Fox, J.C., Crow, D.W., Kocan, K.M., 1998. Experimental transmission of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) by *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.* 74, 277–288. doi:10.1016/S0304-4017(97)00073-3
- Jongejan, F., Uilenberg, G., 2004. The global importance of ticks. *Parasitology* 129, 3–14. doi:10.1017/S0031182004005967
- Karlsson, M.E., Andersson, M.O., 2016. *Babesia* species in questing *Ixodes ricinus*, Sweden. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 7, 10–12. doi:10.1016/j.ttbdis.2015.07.016
- Kocan, K.M., Goff, W.L., Stiller, D., Claypool, P.L., Edwards, W., Ewing, S.A., Hair, J.A., Barron, S.J., 1992. Persistence of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) transferred successively from infected to susceptible calves. *J Med Entomol* 29, 657–668. doi:10.1093/jmedent/29.4.657
- Konstantinidis, K.T., Ramette, A., Tiedje, J.M., 2006. The bacterial species definition in the genomic era. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 361, 1929–1940. doi:10.1098/rstb.2006.1920
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874. doi:10.1093/molbev/msw054
- Lv, J., Wu, S., Zhang, Y., Chen, Y., Feng, C., Yuan, X., Jia, G., Deng, J., Wang, C., Wang, Q., Mei, L., Lin, X., 2014. Assessment of four DNA fragments ( COI , 16S rDNA , ITS2 , 12S rDNA ) for species identification of the Ixodida ( Acari : Ixodida ). *Parasit. Vectors* 7, 93. doi:10.1186/1756-3305-7-93
- Lv, J., Wu, S., Zhang, Y., Zhang, T., Feng, C., Jia, G., Lin, X., 2013. Development of a DNA barcoding system for the Ixodida (Acari: Ixodida). *Mitochondrial DNA* 1736, 1–8. doi:10.3109/19401736.2013.792052
- M'ghirbi, Y., Bouattour, A., 2008. Detection and molecular characterization of *Babesia canis vogeli* from naturally infected dogs and *Rhipicephalus sanguineus* ticks in Tunisia. *Vet. Parasitol.* 152, 1–7. doi:10.1016/j.vetpar.2007.12.018
- Magnarelli, L.A., 2009. Global Importance of Ticks and Associated Infectious Disease Agents. *Clin.*

- Microbiol. Newsl. 31, 33–37. doi:10.1016/j.clinmicnews.2009.02.001
- Maia-Silva, M., 2017. *Rhipicephalus sanguineus* group (Acari: Ixodida) of Western Iberia Peninsula and Africa: Mitochondrial lineages study. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Mangold, A.J., Bargues, M.D., Mas-Coma, S., 1998. Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among Metastriata (Acari: Ixodidae). *Parasitol. Res.* 84, 478–484. doi:10.1007/s004360050433
- Moraes-Filho, J., Marcili, A., Nieri-Bastos, F.A., Richtzenhain, L.J., Labruna, M.B., 2011. Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. *Acta Trop.* 117, 51–55. doi:10.1016/j.actatropica.2010.09.006
- Ramos, R.A.N., Latrofa, M.S., Giannelli, A., Lacasella, V., Campbell, B.E., Dantas-Torres, F., Otranto, D., 2014. Detection of *Anaplasma platys* in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* group ticks by a quantitative real-time PCR. *Vet. Parasitol.* 205, 285–288. doi:10.1016/j.vetpar.2014.06.023
- Rosa, F., Crespo, M., Ferreira, D., Morgado, M., Madeira, M., Santos-Silva, M.M., Santos, A.S., Sousa, R., 2006. Ticks on Dogs and Its Role As Vectors/ Intermediate Hosts in the Center-West of Portugal. 11th Int. Congr. Parasitol. ICOPA XI 567–570.
- Rossen, L., Nørskov, P., Holmstrøm, K., Rasmussen, O.F., 1992. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int. J. Food Microbiol.* 17, 37–45. doi:10.1016/0168-1605(92)90017-W
- Rufino, C.P., Moraes, P.H.G., Reis, T., Campos, R., Aguiar, D.C.F., McCulloch, J.A., Meneses, A.M.C., Gonçalves, E.C., 2013. Detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* DNA using multiplex PCR. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 13, 846–50. doi:10.1089/vbz.2013.1303
- Sanches, G.S., Évora, P.M., Mangold, A.J., Jittapalapong, S., Rodriguez-Mallon, A., Guzmán, P.E.E., Bechara, G.H., Camargo-Mathias, M.I., 2016. Molecular, biological, and morphometric comparisons between different geographical populations of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.* 215, 78–87. doi:10.1016/j.vetpar.2015.11.007
- Santos-Silva, M.M., Melo, P., Santos, N., Antunes, S., Duarte, L.R., Ferrolho, J., Milhano, N., Santos, P.T., Domingos, A., Santos, A.S., 2017. PCR screening of tick-borne agents in sensitive conservation areas, Southeast Portugal. *Mol. Cell. Probes* 31, 42–45. doi:10.1016/j.mcp.2016.11.005
- Schaarschmidt, D., Gilli, U., Gottstein, B., Marreros, N., Kuhnert, P., Daepfen, J.A., Rosenberg, G., Hirt, D., Frey, C.F., 2013. Questing *Dermacentor reticulatus* harbouring *Babesia canis* DNA associated with outbreaks of canine babesiosis in the Swiss Midlands. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 4, 334–340. doi:10.1016/j.ttbdis.2013.01.007
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., Johne, R., 2012. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J. Appl. Microbiol.* doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x
- Schwan, T., 2011. Natural History of Ticks: Evolution, Adaptation and Biology, em: Critical Needs and Gaps in Understanding Prevention, Amelioration, and Resolution of Lyme and Other Tick-Borne Diseases. National Academies Press, Washington, D.C. doi:10.17226/13134
- Sedlackova, T., Repiska, G., Celec, P., Szemes, T., Minarik, G., 2013. Fragmentation of DNA affects the accuracy of the DNA quantitation by the commonly used methods. *Biol. Proced. Online* 15, 5. doi:10.1186/1480-9222-15-5
- Silva, M.M., Santos, A.S., Formosinho, P., Bacellar, F., 2006. Carraças associadas a patologias infecciosas em Portugal. *Acta Med. Port.* 19, 39–48.
- Sumrandee, C., Baimai, V., Trinachartvanit, W., Ahantarig, A., 2015. Hepatozoon and Theileria

- species detected in ticks collected from mammals and snakes in Thailand. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 6, 309–315. doi:10.1016/j.ttbdis.2015.02.003
- Szabó, M.P.J., Mangold, A.J., João, C.F., Bechara, G.H., Guglielmone, A.A., 2005. Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. *Vet. Parasitol.* 130, 131–140. doi:10.1016/j.vetpar.2005.03.008
- Tabar, M.D., Altet, L., Francino, O., Sánchez, A., Ferrer, L., Roura, X., 2008. Vector-borne infections in cats: Molecular study in Barcelona area (Spain). *Vet. Parasitol.* 151, 332–336. doi:10.1016/j.vetpar.2007.10.019
- Tamura, K., Nei, M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10, 512–26. doi:10.1093/molbev/msl149
- Tokuda, Y., Nakamura, T., Satonaka, K., Maeda, S., Doi, K., Baba, S., Sugiyama, T., 1990. Fundamental study on the mechanism of DNA degradation in tissues fixed in formaldehyde. *J. Clin. Pathol.* 43, 748–51. doi:10.1136/jcp.43.9.748
- Tveten, A.K., Riborg, A., Vadseth, H.T., 2013. DGGE identification of microorganisms associated with *borrelia burgdorferi* sensu lato- or *anaplasma phagocytophilum* -infected *ixodes ricinus* ticks from northwest Norway. *Int. J. Microbiol.* 2013. doi:10.1155/2013/805456
- van Treuren, W., Ponnusamy, L., Brinkerhoff, R.J., Gonzalez, A., Parobek, C.M., Juliano, J.J., Andreadis, T.G., Falco, R.C., Ziegler, L.B., Hathaway, N., Keeler, C., Emch, M., Bailey, J.A., Roe, R.M., Apperson, C.S., Knight, R., Meshnick, S.R., 2015. Variation in the microbiota of *Ixodes* ticks with regard to geography, species, and sex. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 6200–6209. doi:10.1128/AEM.01562-15
- Walker, A.R., Bouattour, A., Camicas, J.L., Estrada-peña, A., Horak, I.G., Latif, A.A., Pegram, R.G., Preston, P.M., 2003. Ticks of domestic animals in Africa: a guide to identification of species. *Univ. Edinburgh* 227.
- Welc-Falęciak, R., Bajer, A., Paziewska-Harris, A., Baumann-Popczyk, A., Siński, E., 2012. Diversity of *Babesia* in *Ixodes ricinus* ticks in Poland. *Adv. Med. Sci.* 57, 364–9. doi:10.2478/v10039-012-0023-9
- Yabsley, M.J., McKibben, J., Macpherson, C.N., Cattán, P.F., Cherry, N.A., Hegarty, B.C., Breitschwerdt, E.B., O'Connor, T., Chandrashekar, R., Paterson, T., Perea, M.L., Ball, G., Friesen, S., Goedde, J., Henderson, B., Sylvester, W., 2008. Prevalence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Hepatozoon canis*, *Bartonella vinsonii berkhoffii*, and *Rickettsia* spp. in dogs from Grenada. *Vet. Parasitol.* 151, 279–285. doi:10.1016/j.vetpar.2007.11.008
- Zemtsova, G.E., Apanaskevich, D.A., Reeves, W.K., Hahn, M., Snellgrove, A., Levin, M.L., 2016. Phylogeography of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato and its relationships with climatic factors. *Exp. Appl. Acarol.* 69, 191–203. doi:10.1007/s10493-016-0035-4

## 8 Anexos

### 8.1 Protocolo 1 – Extração de DNA (E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit)

1. Remover quatro patas do espécime, do mesmo lado, evitando danificar outras estruturas, à lupa.
  - a. Colocar espécime e as patas previamente removidas num tubo de 1.5 mL e adicionar 200 µL de TL Buffer.
2. Iniciar procedimento do kit, partindo do ponto 3 do protocolo do kit:
  - a. Adicionar 25 µL de OB Protease Solution.
  - b. Agitar rigorosamente durante cinco minutos
3. Incubar a 55°C, em banho maria com agitação, durante a noite (8 a 16 horas).
4. Adicionar 4 µL de RNase A por 30 mg de tecido.
  - a. Repousar dois minutos.
5. Centrifugar à velocidade máxima por cinco minutos.
6. Transferir sobrenadante para outro tubo de 1.5 mL.
7. Adicionar ao novo tubo 220 µL de BL Buffer. Vórtex 15 segundos.
  - a. Incubar a 70° C dez minutos.
8. Adicionar 220 µL de Etanol. Vórtex 15 segundos.
9. Por a HiBind DNA Column num tubo de 2 mL fornecido.
  - a. Adicionar 100 µL de Equilibration Buffer à coluna.
  - b. Centrifugar à velocidade máxima por um minuto. Descartar líquido.
  - c. Transferir a amostra para a coluna.
10. Centrifugar à velocidade máxima um minuto. Descartar filtrado e reutilizar tubo.
11. Adicionar 500 µL de HBC Buffer.
  - a. Centrifugar à velocidade máxima 30 segundos.
  - b. Descartar líquido e tubo fornecido.
  - c. Por a HiBind DNA Mini Column num tubo de 2 mL fornecido.
12. Adicionar 700 µL de DNA Wash Buffer.
  - a. Centrifugar à velocidade máxima um minuto.
  - b. Descartar filtrado e reutilizar tubo.
13. Adicionar 500 µL de DNA Wash Buffer.
  - a. Centrifugar à velocidade máxima um minuto.
  - b. Descartar filtrado e reutilizar o tubo.
14. Centrifugar à velocidade máxima três minutos.
15. Transferir coluna para um tubo de 1.5 mL estéril.
16. Adicionar 100 µL de Elution Buffer a 70°C.
  - a. Deixar assentar dois minutos.
  - b. Centrifugar à velocidade máxima um minuto.
17. Adicionar 100 µL de Elution Buffer a 70°C.
  - a. Deixar assentar dois minutos.
  - b. Centrifugar à velocidade máxima um minuto.
18. Guardar DNA a -20°C.

## **8.2 Protocolo 2 – Amplificação por PCR do marcador COI:**

### **8.2.1 Primers LCO1490\_F / HCO2198\_R**

Cada reacção foi realizada com um volume total de 25 µL consistindo em 8.4 µL de ddH<sub>2</sub>O, 2.5 µL de Tampão, 1 µL de dNTPs, 1 µL de MgCl<sub>2</sub>, 1 µL de cada primer, 2 µL de BSA, 0.1 µL de Taq (NZYTech LDA., Lisboa – Portugal) e 8 µL de DNA genómico de carraça. O protocolo de PCR consistiu numa desnaturação inicial a 94°C durante um minuto, 40 ciclos de 95°C por um minuto, 35°C por um minuto e 72°C por um minuto, e uma extensão final a 72°C durante sete minutos.

### **8.2.2 Primers Cox1F / Cox1R**

Cada reacção foi realizada com um volume total de 25 µL consistindo em 8.4 µL de ddH<sub>2</sub>O, 2.5 µL de Tampão, 1 µL de dNTPs, 1 µL de MgCl<sub>2</sub>, 1 µL de cada primer, 2 µL de BSA, 0.1 µL de Taq (NZYTech LDA., Lisboa – Portugal) e 8 µL de DNA genómico de carraça. O protocolo de PCR consistiu numa desnaturação inicial a 95°C durante cinco minutos, 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 35°C por um minuto e 72°C por um minuto, e uma extensão final a 72°C durante cinco minutos.

## **8.3 Protocolo 3 – Amplificação por PCR do marcador 16S**

Cada reacção foi realizada com um volume total de 25 µL consistindo em 10.15 µL de ddH<sub>2</sub>O, 2.5 µL de Tampão, 1 µL de dNTPs, 1.25 µL de MgCl<sub>2</sub>, 1 µL de cada primer, 0.1 µL de Taq (NZYTech LDA., Lisboa – Portugal) e 8 µL de DNA genómico de carraça. O protocolo de PCR consistiu numa desnaturação inicial a 94°C durante dois minutos, 40 ciclos de 94°C por 45 segundos, 35°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos, e uma extensão final a 72°C durante sete minutos.

## **8.4 Protocolo 4 – Amplificação por PCR do marcador 12S**

Cada reacção foi realizada com um volume total de 25 µL consistindo em 10.15 µL de ddH<sub>2</sub>O, 2.5 µL de Tampão, 1 µL de dNTPs, 1.25 µL de MgCl<sub>2</sub>, 1 µL de cada primer, 0.1 µL de Taq (NZYTech LDA., Lisboa – Portugal) e 8 µL de DNA genómico de carraça. O protocolo de PCR consistiu numa desnaturação inicial a 94°C durante dois minutos, 40 ciclos de 94°C por 45 segundos, 35°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos, e uma extensão final a 72°C durante sete minutos.

## **8.5 Protocolo 5 – Electroforese em gel de agarose**

- a) Preparação do gel:
  - 2% agarose (2g agarose e 100 mL TBE 0.5x para um gel grande ou 1g agarose e 50 mL de TBE 0.5x para um gel pequeno)
  - 1.25 µL de Red Safe por grama de agarose
- b) Colocação da amostra no gel:
  - 2 µL de Green Buffer + 4 µL de produto de PCR

## **8.6 Protocolo 6 – Purificação de DNA (SureClean Plus Kit)**

- 1. Adicionar volume de SureClean igual à quantidade de solução de DNA e agitar 15s.
- 2. Incubar 15 minutos à temperatura ambiente.
- 3. Centrifugar à velocidade máxima 15 minutos.
  - a. Remover cuidadosamente o sobrenadante.
- 4. Adicionar o dobro do volume de amostra inicial em etanol a 70% e levar ao vórtex 15 segundos.
- 5. Centrifugar à velocidade máxima 10 minutos.
  - a. Remover cuidadosamente o sobrenadante.
- 6. Deixar secar durante a noite.
- 7. Suspender o pellet em 17µL de ddH<sub>2</sub>O.

## **8.7 Protocolo 7 – Amplificação por PCR dos marcadores EC16S/PP18S (agentes patogénicos)**

Cada reacção foi realizada com um volume total de 25 µL consistindo em 10.4 µL de ddH<sub>2</sub>O, 2.5 µL de Tampão, 1 µL de dNTPs, 1 µL de MgCl<sub>2</sub>, 1 µL de cada primer, 0.1 µL de Taq (NZYTech LDA., Lisboa – Portugal) e 8 µL de DNA genómico de carraça. O protocolo de PCR consistiu numa desnaturação inicial a 94°C durante cinco minutos, 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 65°C / 55°C por 30 segundos (foi usada uma temperatura de annealing de 65°C para os primers EC16S e de 55°C para os primers PP18S) e 72°C por 30 segundos, e uma extensão final a 72°C durante sete minutos.

## 8.8 Concentração e pureza do DNA das amostras

Tabela 8.1 Amostras biológicas (carraças) utilizadas neste trabalho onde **ID** corresponde ao registo de cada uma das amostras na Coleção de Parasitologia do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa, A260 / A280 corresponde ao grau de pureza do DNA em relação a proteína, A260 / A230 corresponde ao grau de pureza do DNA em relação a fenóis e [DNA] corresponde à concentração de DNA em nG/μL. <sup>a</sup> significa que foi feita mais que uma medição e este valor é uma média das várias medições.

ID	A260 / A280	A260 / A230	[DNA] (nG/μL)
CV3039	1.76	0.54	7.9
CV3040	1.63	0.46	7.9
CV3041	1.82	0.61	7.1
CV3042	1.84	0.65	11.8
MOC3038	1.05	0.44	4.2
MOC3043	1.61	0.40	3.0
MOC3044	1.30	0.56	7.5
O129	2.49	0.31	2.3
S336	1.75	0.40	2.4
S337	1.40	0.53	4.6
S344	1.66	0.43	3.3
S359	1.18	0.31	1.8
S475	1.74	0.47	17.5
S853	1.76	0.45	18.6
S943	1.78	0.78	7.3
S945	1.50	0.49	106.5
S1060	1.37	0.44	13.0
S333	2.00	0.45	8.0
S358	2.14	0.78	10.3
S435	2.46	0.43	8.6
S554	1.78	0.51	12.8
S630	2.03	0.20	5.1
S710	1.55	0.20	16.0
S1199	1.43	0.50	48.8
O208	1.50 <sup>a</sup>	0.53 <sup>a</sup>	14.0 <sup>a</sup>
GB3052	1.65 <sup>a</sup>	0.84 <sup>a</sup>	11.8 <sup>a</sup>
GB3053	3.28 <sup>a</sup>	0.39 <sup>a</sup>	5.5 <sup>a</sup>
MOC3054	1.60 <sup>a</sup>	0.77 <sup>a</sup>	29.4 <sup>a</sup>
MOC3055	1.67 <sup>a</sup>	0.75 <sup>a</sup>	21.9 <sup>a</sup>
MOC3056	2.22 <sup>a</sup>	1.16 <sup>a</sup>	8.8 <sup>a</sup>
GB3057	1.49 <sup>a</sup>	0.72 <sup>a</sup>	15.9 <sup>a</sup>
GB3058	1.53 <sup>a</sup>	0.90 <sup>a</sup>	24.0 <sup>a</sup>
GB3059	1.47 <sup>a</sup>	0.80 <sup>a</sup>	8.2 <sup>a</sup>
GB3060	1.52 <sup>a</sup>	0.70 <sup>a</sup>	25.9 <sup>a</sup>
Lx3079	1.64 <sup>a</sup>	0.99 <sup>a</sup>	36.8 <sup>a</sup>
Larv_Ixode	1.75 <sup>a</sup>	0.52 <sup>a</sup>	4.5 <sup>a</sup>
A3077	1.55 <sup>a</sup>	0.73 <sup>a</sup>	4.1 <sup>a</sup>
A3078	1.63 <sup>a</sup>	0.78 <sup>a</sup>	2.9 <sup>a</sup>
A3087	2.34	0.53	4.7
A3088	1.74	0.67	8.4
CV3093	1.61	0.45	2.8
CV3094	1.62	0.49	4.6
CV3095	2.03	0.57	7.4
A3102	1.99	0.55	2.3
A3103	2.40	0.48	5.0
SFAB17 M	1.93 <sup>a</sup>	0.09 <sup>a</sup>	6.5 <sup>a</sup>
SFAB17 F	5.01 <sup>a</sup>	0.04 <sup>a</sup>	9.5 <sup>a</sup>
SF3269	2.67	0.6	6.6
SF3270	2.26 <sup>a</sup>	1.75 <sup>a</sup>	7.9 <sup>a</sup>
SF3271	1.99	0.38	8.8
SF3519	2.05	0.53	23.0